

IMPERIAL AGRICULTURAL

RESEARCH INSTITUTE, NEW DELHI.

ARCHIV
FÜR
MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

HERAUSGEGEBEN VON

J. BEHRENS HILDESHEIM · **F. BOAS** MÜNCHEN · **A. RIPPEL** GÖTTINGEN

REDIGIERT VON

J. BEHRENS UND A. RIPPEL

FÜNFTER BAND

MIT 161 TEXTABBILDUNGEN UND 3 TAFELN



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1934

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig
Printed in Germany

Inhalt des 5. Bandes.

Erstes Heft.

Abgeschlossen am 22. Januar 1934.

Seite

Zweites Heft.

Abgeschlossen am 22. März 1934.

Drittes Heft.

Abgeschlossen am 25. Juni 1934.

Viertes Heft.

Abgeschlossen am 28. November 1934.

[Aus dem Laboratorium des städtischen Untersuchungsamtes (Keuringsdienst) in Rotterdam.]

Über Micrococcus Eykmanii n. spec., ein Bakterium, welches für sein Wachstum vitaminartige Stoffe braucht.

Von

L. E. den Dooren de Jong.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 6. August 1933.)

Schon 1897 stellte *Grassberger* (1) fest, daß die *Influenzabakterien* sich auf Blutagar am besten in der Nähe von *Staphylokokken*-Kolonien entwickeln. *Davis* (2) und andere Forscher beobachteten, daß auch viele andere Bakterienarten das Wachstum von *B. influenzae* befördern. Neueste Untersuchungen von *Bokalo, Wedischtschew, Sabanin, Jegorow* und *Grikurow* (3) zeigten, daß auch das Wachstum von *B. pestis* durch die Anwesenheit saprophytischer Bakterien gefördert wird. Da die oben beschriebene Empfindlichkeit von Bakterien dem Einfluß anderer Mikroorganismen gegenüber ausschließlich auf pathogene beschränkt schien, dürfte es nützlich sein, ein saprophytisches Bakterium zu beschreiben, welches diese Eigenschaften in noch stärkerem Maße besitzt als *B. influenzae* und *B. pestis*.



Abb. 1.
Microc. Eykmanii (900 mal) (Stamm 1244) Gram-Präparat.

Beim Ausstrich von ein wenig Bakterienmaterial aus einer zufällig infizierten Kulturflüssigkeit auf 1 % Peptonagar[1] erschien nach einigen Tagen eine große Anzahl äußerst kleiner Kolonien einer *Gram*-positiven *Coccus*-Art (s. Abb. 1), außerdem einzelne *Actinomyces*-Kolonien. Als ich dieselbe Platte nach etwa 2 Wochen noch einmal beobachtete, zeigte es sich, daß die *Coccus*-Kolonien, die sich bis zu

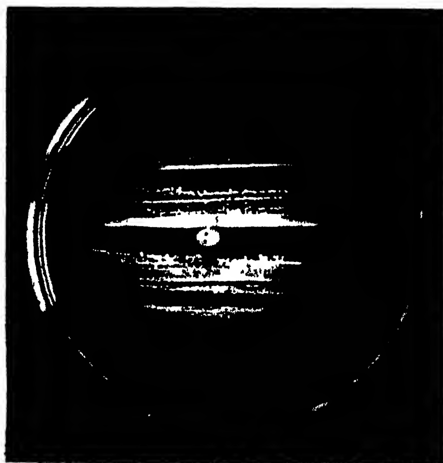


Abb. 2.
Einfluß einer aktiven Kolonie auf einem Ausstrich von Stamm *1244* (1/2 mal).

1 bis 2 cm von den *Actinomyces*-Kolonien entfernt befanden, sich zu Kolonien mit einem Durchmesser von 2 bis 3 mm (s. Abb. 2) entwickelt hatten. Die sich außerhalb dieses Umkreises befindenden Kolonien blieben kaum sichtbar[2].

Um in diese Beobachtung mehr Klarheit zu bringen, mußte zunächst zugesehen werden, ob die *Actinomyceten* sich durch die besondere Eigenschaft kennzeichneten, das Wachstum beliebiger anderer Bakterien zu beeinflussen, oder ob die *Coccus*-Art — die sich obligat aerob zeigte und unter *Nr. 1244* in meine Sammlung aufgenommen wurde — gerade eine besondere Empfindlichkeit bestimmten Stoffwechselprodukten anderer Bakterien gegenüber zeigte.

Dazu wurde eine 1 %ige Peptonagarplatte gänzlich mit Stamm *1244* bestrichen, während 1 Stunde der Luftinfektion ausgesetzt und darauf

[1] Aus später zu erwähnenden Gründen muß für diese Experimente Pepton *Poulenc* pulvérisée (sèche) oder sonst Pepton *Byla* benutzt werden. — [2] Es ergab sich, daß die Bakterien dabei *keine* erbliche Änderung erlitten hatten; von neuem auf 1 % Peptonagar ausgestrichen, wuchsen die beeinflußten Bakterien ebenso kümmerlich wie vorher.

2 Tage lang bei 30° C bebrütet. Wie Abb. 3 zeigt, übertraf das Ergebnis bei weitem die Erwartungen. Mehr als 50 Kolonien erschienen, welche von Wachstumsfeldern von *Nr. 1244* umgeben wa Der Durchmesser dieser letzten war bisweilen mehr als 2 cm. ergab sich jedoch auch, daß ein nicht unbedeutender Prozentsatz Luftkeime keinen Einfluß auf Stamm *1244* ausübte.

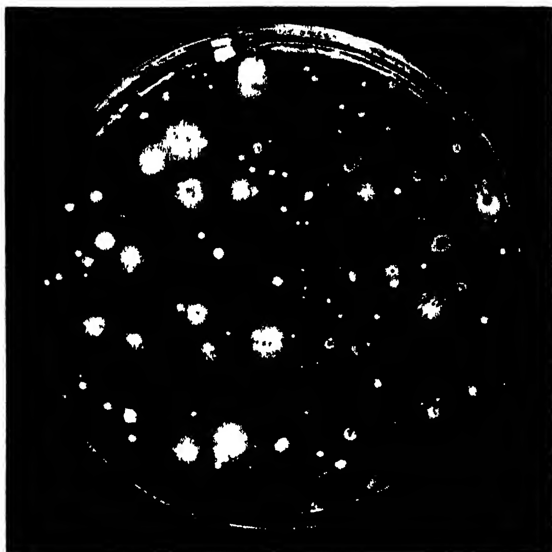


Abb. 3.
Wirkung der Luftinfektion auf Stamm *1244* (2/3 mal).

Um einige Kolonien entstand dagegen nur eine Zone, in der das Wachstum von *1244* statt gefördert zu sein, ganz gehemmt worden war, und die eine Breite von mehreren Millimetern besitzen konnte. In anderen Fällen wurde um die Kolonien nur ein schmaler Ring von noch nicht 1 mm gebildet, in dem kein Wachstum auftrat, außerhalb dessen aber das Wachstum auf dieselbe Weise wie bei den erstgenannten Kolonien gefördert wurde. Offenbar tritt bei dieser Wachstumshemmung das Phänomen auf, das von *Söhngen* (4) unter dem Namen „Heterobakteriovorie" beschrieben worden ist.

Da möglicherweise die Luftkeime, die sich *nicht* aktiv zeigten, viel später zur Entwicklung gekommen sein könnten als die anderen, wurden von beiden Arten je zehn Kolonien in Reinkultur gebracht[1].

[1] Mikroskopische Beobachtung zeigte, daß sowohl die Bakterien der einen Gruppe wie jene der anderen Gruppe zu den *Coccaceen* und den *Bacteriaceen* gehörten. Einer der aktiven Stämme gehörte zu den *Actinomyceten*.

Darauf wurde eine nicht zu geringe Menge der 20 Reinkulturen auf Ausstriche des Stammes *1244* gebracht. Nach einer zweitägigen Bebrütung bei 30° C ergab sich in Übereinstimmung mit Obigem, daß die zehn ersten Stämme sehr aktiv waren und große Auxanogramme bildeten, und daß die übrigen Stämme dieses Vermögens ganz und gar entbehrten.

Wenn synthetische Nährböden wie etwa Leitungswasseragar mit 0,1 % K_2HPO_4, dem z. B. 0,5 % Asparagin zugefügt worden war, nach Bestreichung mit Stamm *1244* der Luftinfektion ausgesetzt wurden, so trat — obgleich weniger stark als auf den Peptonnährböden — um mehrere Kolonien herum gleichfalls Wachstumsverstärkung auf.

Da die Luftkeime im allgemeinen schwierig zu identifizieren waren, wurden 100 Bakterienarten aus meiner Sammlung, zu den verschiedensten aeroben und fakultativ anaeroben Bakteriengattungen (*Bacillus*, *Bacterium*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Acetobakter*, *Vibrio* und *Spirillum*) gehörig, auf Ausstriche von Stamm *1244* gebracht. Es zeigte sich, daß, mit Ausnahme von *Microc. albus* und von *Microc. roseus*, alle untersuchten Stämme die Fähigkeit besaßen, Stamm *1244* zu beeinflussen[1]. Bei näherer Untersuchung ergab sich zu gleicher Zeit, daß auch *Hefen* und *Schimmelpilze* hinsichtlich des Stammes *1244* wachstumsstimulierende Eigenschaften besaßen.

Weiterhin war zu untersuchen, ob in der Natur Bakterien vorkommen, welche dieselbe Sensibilität für die Stoffwechselprodukte anderer Mikroben zeigen wie Stamm *1244*. Da derartige Bakterien auf Peptonagar nicht oder kümmerlich wachsen würden, kamen dafür in physiologischer Hinsicht in Betracht die Bakterien der Gattung *Streptococcus*, *Azotobakter* und der Sporenbildner *Bac. fastidiosus*[2], weiter die kümmerlich wachsenden Stämme *Protam. rubrum*[3], der zuvor genannte inaktive *Microc. albus* und *Microc. roseus*, außerdem *Staph. pyogenes albus*, *citreus* und *aureus* sowie schwach wachsende, nicht aktive Luftkeime, welche oben erwähnt wurden. Zu diesem Zwecke wurden diese Bakterien entweder auf Peptonagar ausgestrichen und während 1 Stunde der Luftinfektion ausgesetzt oder mit einzelnen Stämmen, welche sich bei der vorhergehenden Untersuchung sehr aktiv gezeigt hatten, bestrichen.

[1] Es ist daher auffallend, daß die Luftkeime aus einer relativ großen Anzahl inaktiver Bakterien bestehen. — [2] Ein von mir beschriebener (Centralbl. f. Bakt. II, 79, 344, 1929) aerober Sporenbildner, der die merkwürdige Fähigkeit besitzt, ausschließlich Harnsäure und Allantoin zu dissimilieren, und der, ebenso wie *Streptococcus* und *Azotobacter*, nicht auf Peptonagar wächst. — [3] Siehe *L. E. den Dooren de Jong*, Über protaminophage Bakterien, Centralblatt f. Bakt. II, 71, 193, 1927.

Keine der Kulturen zeigte um die darauf entstandenen oder gebrachten Bakterienkolonien Wachstumsverstärkung, und da es bei späteren Versuchen niemals gelungen ist, ein Bakterium wie Stamm *1244* aus der Luft oder aus dem Boden zu isolieren, muß daraus geschlossen werden, daß derartige Bakterien selten sind. Außerdem zeigt sich hieraus, daß die *Staphylokokken*, deren Wachstum nach *Hughes* (5) durch Fleischextrakt gefördert wird, für ein anderes Stimulans empfänglich sein müssen wie Stamm *1244*, da sie im Gegensatz zu dem letztgenannten Stamm *nicht* durch Luftkeime stimuliert werden. Auch seine Beobachtung, daß Filtrate von *Coli*-Kulturen — die ich später eingehender behandeln werde — keinen Einfluß auf *Staphylokokken* ausuben, wohl jedoch die alkoholischen Extrakte dieser Bakterien, stimmt mit dieser Ansicht uberein.

Um einen Einblick in die Natur des wachstumsfördernden Prinzips zu erhalten, wurde ein Tropfen 4 n HCl und ein Tropfen 4 n NaOH auf eine Peptonagarplatte, die mit Stamm *1244* bestrichen worden war, gegossen. Es zeigte sich, daß die beiden Verbindungen, soweit sie in einer genügenden Konzentration in der Platte diffundierten, ausschließlich eine wachstumsvernichtende, niemals eine wachstumsfördernde Wirkung auf den betreffenden Stamm ausübten. An zweiter Stelle wurde auf einen Ausstrich von Stamm *1244* ein Tropfen einer sterilisierten 95%igen Glucose- und einer 30%igen Peptonlösung[1] gegossen. Auch jetzt ergab sich nach einigen Tagen, daß diese Stoffe keine Verstärkung des Wachstums verursachten.

Obige Versuche werden deutlich gemacht haben, daß die Erscheinung der Wachstumsförderung eine tiefere Ursache haben muß, als wir oben vorausgesetzt haben. Die Hypothesen, welche zunächst fur eine Erklärung in Betracht kommen, sind folgende:

I. Stamm *1244* wachst, indem er eine spezifische Verbindung, die von den aktivierenden Bakterien aus dem Pepton bzw. aus Verbindungen wie z. B. Asparagin gebildet wird, als Nahrung verwertet.

II. Stamm *1244* wächst, indem er Pepton bzw. die genannten Verbindungen als Nahrung verwertet, aber nur wenn daneben Wachstumsstoffe (Auxine) oder vitaminartige Substanzen vorhanden sind, welche die Fähigkeit besitzen, in äußerst geringen Mengen obengenannte Verbindungen als Nahrung zu vervollständigen.

Zur Prüfung dieser beiden Hypothesen wurden verschiedene Bakterienarten, deren Verhalten hinsichtlich des Stammes *1244* bekannt

[1] Dasselbe Pepton, das für die Bereitung der Platten benutzt wurde. Das Pepton sowie die Glucose wurden sterilisiert, um zu verhindern, daß infizierende Bakterien ihren stimulierenden Einfluß ausüben konnten.

war, einige Zeit, z. B. 4 Tage, lang in 1 % Peptonwasser kultiviert. Mittels Filtration durch *Seitz*-Filter wurde die Kulturflüssigkeit von den Bakterien geschieden. Wenn nun diese Filtrate in abnehmenden Mengen (z. B. 5, 1, 0,2 und 0,1 ccm) sowohl z. B. zu 30 ccm 1 %igem verflüssigten und auf 50° C abgekühlten Peptonagar als auch zu 30 ccm ausgewaschenem 1 %igen Leitungswasseragar[1] (welcher also keine Nährstoffe enthält) zugefügt wurden und dieser Agar zu Platten ausgegossen und mit einer und derselben Aufschwemmung von Stamm *1244* bestrichen wurde, so würden dessen Kolonien im ersten Falle (I) sich bei Hinzufügung gleicher Mengen des betreffenden Filtrats auf beiden Plattenarten immer gleich stark entwickeln, und zwar um so stärker, je mehr vom Filtrat hinzugefügt wurde. Im zweiten Falle (II) würden sich die Kolonien von *1244* auf den Pepton- und Leitungswasseragarplatten vielleicht nur bei Zufügung größerer Filtratmengen (5 ccm) in gleicher Weise entwickeln durch das im Filtrat eventuell noch vorhandene oder nicht abgebaute Pepton. Bei höheren Verdünnungen (0,2 und 0,1 ccm) würde dagegen das Wachstum auf den Leitungswasseragarplatten immer mehr hinter dem auf den entsprechenden Peptonagarplatten zurückbleiben und schließlich dem schwachen Wachstum gleich werden, das auf dem 1 %igen Peptonagar ohne Zusatz auftritt. Selbstverständlich würde dann bei sehr hoher Verdünnung des Filtrats (z. B. 0,001 oder 0,0001 ccm) schließlich auch das Wachstum auf Peptonagar nicht mehr stimuliert werden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick des Ergebnisses der Versuche, nachdem die Kulturplatten 4 Tage lang bei 30° C bebrütet waren:

Microc. roseus (1020)	Auf 1 % Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
5 ccm Filtrat *1020*	schwaches Wachstum	schwaches Wachstum
1 „ „ *1020*	„ „	„ „

Das Ergebnis dieser Versuche steht mit der oben festgestellten Tatsache, daß *Microc. roseus* auch auf dem festen Nährboden keinen wachstumsfördernden Einfluß ausübt, in voller Übereinstimmung.

B. aerogenes (1037)	Auf 1% Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
5 ccm Filtrat *1037*	sehr starkes Wachstum	mäßiges Wachstum
1 „ „ *1037*	starkes Wachstum	sehr mäßiges Wachstum
0,2 „ „ *1037*	sehr gutes Wachstum	„ „ „
0,1 „ „ *1037*	gutes Wachstum	schwaches Wachstum

[1] Es wäre vielleicht besser, wenn diese Experimente in Flüssigkeitskulturen vorgenommen wären. Die Unfähigkeit des Stammes *1244*, darauf Häute zu bilden, führte dazu, mit festen Nährböden zu arbeiten.

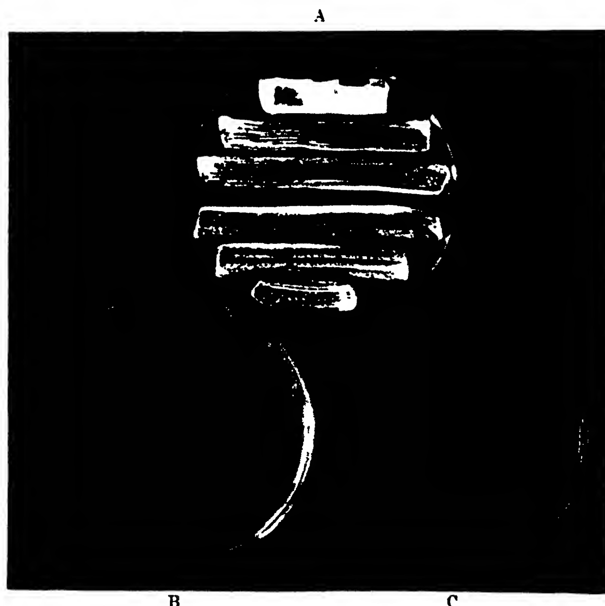
Ps. pyocyanea (1051)	Auf 1 % Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
1 ccm Filtrat *1051*	sehr starkes Wachstum	schwaches Wachstum
0,2 „ „ *1051*	starkes Wachstum	„ „
0,1 „ „ *1051*	ziemlich starkes Wachstum	„ „

Bac. mesentericus (1174)	Auf 1 % Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
1 ccm Filtrat *1174*	sehr starkes Wachstum	schwaches Wachstum
0,2 „ „ *1174*	starkes Wachstum	„ „
0,1 „ „ *1174*	„ „	„ „

Die letzten drei Versuchsreihen liefern den überzeugenden Beweis, daß in höheren Verdünnungen (0,2 und 0,1 ccm) die Filtrate an sich zur Förderung des Wachstums des Stammes *1244* völlig untauglich sind, da in diesen Fällen das Wachstum auf Leitungswasseragarplatten so gut wie ganz ausbleibt und praktisch nicht vom Wachstum auf 1 %igen Peptonagar ohne weitere Zufügung zu unterscheiden ist. Der gleiche geringe Zusatz befördert dagegen in hohem Maße das Wachstum des Stammes *1244* auf Platten, welche außerdem 1 % Pepton enthalten.

All dieses zwingt zur Annahme der zweiten Hypothese, so daß die wachstumsfördernde Wirkung der Filtrate der Anwesenheit vitaminähnlicher Stoffe zugeschrieben werden muß. Abb. 4 gibt uns einen

A



B C

Abb. 4.

A: Platte mit 1 %igem Peptonagar, dem 0,2 ccm von einem aktiven Filtrate hinzugefügt wurde.
B: Platte mit Leitungswasseragar, dem 0,2 ccm von einem aktiven Filtrate hinzugefügt wurde.
C: Platte mit 1 %igem Peptonagar ohne Filtrat.

Begriff von der Wirkung der Filtrate hinsichtlich des Wachstums von Stamm *1244*.

Nach diesen Versuchen mit Filtraten von Bakterienkulturen lag es, auch im Hinblick auf die Versuche *Werkmans* (6), nahe zu prufen, ob auch Pflanzenextrakte und tierische Safte das Wachstum von Stamm *1244* fördern. Weil die Kartoffel sich so vorzuglich zur Kultur der Bakterien eignet[1], wurde an erster Stelle Kartoffelextrakt bereitet. Dazu wurden geschälte Kartoffeln in einer Mühle fein gemahlen, ausgepreßt, der Saft erst durch Watte, später durch ein *Seitz*-Filter filtriert[2] und schließlich in abnehmenden Mengen zu Pepton- und Leitungswasseragar zugefügt. Darauf wurden beide Reihen Platten mit Stamm *1244* bestrichen. Nach einer 4tagigen Bebrütung bei 30° C ergab sich folgendes:

Kartoffelextrakt	Auf Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
5 ccm Filtrat	enormes Wachstum	maßiges Wachstum
1 „ „	sehr starkes Wachstum	„ „
0,2 „ „	starkes Wachstum	schwaches Wachstum
0,1 „ „	„ „	„ „
0,05 „ „	gutes Wachstum	„ „
0,02 „ „	„ „	„ „
0,01 „ „	maßiges Wachstum	„ „

Ähnliche, obgleich weniger schöne Ergebnisse wurden mit Citronen-, Apfelsinen- und Malzextrakt erhalten.

Von den tierischen Flussigkeiten wurde an erster Stelle Harn untersucht. Dieser wurde zur Sterilisation durch ein *Seitz*-Filter filtriert. Harnzusatz hatte folgendes Ergebnis:

Harn	Auf 1% Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
5 ccm Filtrat	sehr starkes Wachstum	schwaches Wachstum
1 „ „	sehr gutes Wachstum	„ „
0,2 „ „	gutes Wachstum	„ „
0,1 „ „	„ „	„ „

Außerdem wurde der aus Fleisch gepreßte Saft mit positivem Ergebnis auf gleiche Weise untersucht. Aus obigen Versuchen ergibt sich, daß mehrere pflanzliche und tierische Flüssigkeiten, ebenso wie Kulturflüssigkeitsfiltrate, in hohem Maße die Fähigkeit zur Forderung des Wachtums von Stamm *1244* besitzen.

---

[1] Siehe dafür auch *J. Thomson* J. of Bact. 17, 379, 1929. — [2] Der auf diese Weise erhaltene Kartoffelextrakt hat eine blauschwarze Farbe und die Eigenschaft, stark zu schäumen. Schon bei Erhitzen auf 80° C tritt Koagulation sehr dunkel gefärbter eiweißartiger Verbindungen ein. Die Flüssigkeit selbst bekommt dann eine hellgelbe Farbe und besitzt auch dann noch wachstumsfördernde Eigenschaften.

Um die wachstumsstimulierenden Stoffe nicht oder doch möglichst wenig zu schädigen, wurden sie bis jetzt immer durch Filtration sterilisiert. Um die Wirkung der Erhitzung auf diese Stoffe zu untersuchen, wurden mehrere aktive Bakterienfiltrate sowie auch Kartoffelextrakt- und Harnfiltrate in einem Wasserbade 10 Minuten lang auf 100° C erhitzt und ihre Wirkung mit der entsprechender nicht erhitzter Filtrate verglichen. Untenstehende Tabelle gibt hiervon ein Beispiel.

Ps. pyocyanea 1051	Wachstum auf 1 % Peptonagar	
	10 Min. auf 100° C	unerhitzt
1 ccm Filtrat *1051*	sehr starkes Wachstum	sehr starkes Wachstum
0,5 „ „ *1051*	starkes Wachstum	starkes Wachstum
0,2 „ „ *1051*	„ „	„ „
0,1 „ „ *1051*	gutes Wachstum	gutes Wachstum
0,05 „ „ *1051*	ordentliches Wachstum	ordentliches Wachstum
0,02 „ „ *1051*	ziemlich gutes Wachstum	ziemlich gutes Wachstum

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß dieses Erhitzen nicht die geringste schädigende Wirkung auf das wachstumsfördernde Prinzip ausübte. Andere Versuche zeigten, daß sogar Erhitzen unter Druck (20 Minuten auf 120° C) nicht störte.

Das vielfache Vorkommen wachstumsfördernder Stoffe und ihre Thermostabilität führte mich dazu, die Frage näher zu betrachten, ob tatsächlich alle Peptone hiervon so gänzlich frei wären wie das bis jetzt ausschließlich benutzte Pepton *Poulenc* sèche (pulvérisée). Dazu wurde auf die übliche Weise (Sterilisation 20 Minuten bei 120° C) eine Anzahl Platten von 1 % Peptonagar verschiedener Herkunft bereitet, die mit Stamm *1244* bestrichen wurden. Nach einer 4tägigen Bebrütung bei 30° C ergab sich folgendes:

Fabrikat	Maß des Wachstums
Chapoteaut	sehr gutes bis starkes Wachstum
Poulenc (pepsique)	„ „ „ „ „
Witte	gutes Wachstum
Merck (trocken)	ziemlich gutes Wachstum
Chassaing	„ „ „
Brunnengräber	„ „ „
Difco	mäßiges Wachstum
Merck (aus Casein)	sehr mäßiges Wachstum
Byla	schwaches Wachstum
Poulenc sèche (pulvérisée)	„ „

Daraus ist ersichtlich, daß das Pepton *Poulenc* sèche, das stets für die Versuche benutzt wurde, zufälligerweise zu den sehr wenigen Peptonen gehört, die sich zu diesen Versuchen überhaupt eignen. Wäre Stamm *1244* z. B. auf Pepton *Chapoteaut* oder Pepton *Poulenc* pepsique

oder sogar auf Pepton *Witte* isoliert worden, so hätte man sein merkwürdiges Verhalten nicht entdeckt[1].

Weil die Möglichkeit bestand, daß das wachtumsfördernde Prinzip mit den Auxinen, welche bei den höheren Pflanzen die Zellstreckung befördern, identisch ist, so wurde im botanischen Laboratorium in Utrecht (dank dem großen Wohlwollen des Direktors Prof. Dr. *F. A. F. C. Went*) durch Dr. *H. G. van der Weij* eine Untersuchung eingeleitet. Dazu wurden von zwei inaktiven Stämmen, nämlich *Microc. albus* und *Microc. roseus*, und zwei aktiven Stämmen, namlich *Bac. mesentericus* und *Sarcina lutea*, Impfstriche auf Peptonagarplatten gemacht. Nachdem die Kulturen 4 Tage alt geworden waren, wurden Stuckchen Agar auf eine Entfernung von 1 bis 10 mm von der Bakterienkultur aus der Platte gestochen und auf bekannte Weise[2] auf Krummung untersucht. Es zeigte sich, daß:

Nr. 1019, *Microc. albus* (inaktiv)	eine	Krummung	gab	von	13,0°
„ 1020, *Microc. roseus* (inaktiv)	„	„	„	„	9,1°
„ 1022, *Sarcina lutea* (aktiv)	„	„	„	„	10,6°
„ 1174, *Bac. mesentericus* (aktiv)	„	„	„	„	17,4°

(Eine Auxinlosung von $^1/_{150\,000}$ mg je Kubikzentimeter gab bei den benutzten Pflanzen eine Krümmung von 8,5°.)

Hieraus ergibt sich, daß das wachstumsfordernde Prinzip mit den Auxinen unmöglich identisch sein kann.

Obgleich die Tatsache, daß das Prinzip noch in hoher Verdunnung die Fahigkeit besitzt, einen aktivierenden Einfluß auf das Wachstum von Stamm *1244* auszuuben, ausschließt, daß es zu den normalen Dissimilationsubstraten gerechnet werden muß, so war es doch wichtig, das Prinzip so weit als moglich von inaktiver Substanz zu reinigen, um das Minimum des organischen Stoffes, in Milligramm ausgedruckt, zu bestimmen, welche noch die Fahigkeit zur Beeinflussung von Stamm *1244* besitzen wurde. Die chemische Prufung, die ich der freundlichen Vermittlung von Dr. *W. Schut*, Chemiker an dem stadtischen Untersuchungsamt, verdanke, wurde in folgender Weise vorgenommen: Ein *Erlenmeyer*kolben mit 250 ccm 1%igem Peptonwasser wurde mit *Ps. pyocyanea* (Stamm *1051*) geimpft. Um so viel als moglich vom wachstumsfordernden Prinzip zu erhalten, wurde die Kultur 14 Tage bei 30° C bebrutet. Darauf wurde durch ein *Seitz*-Filter filtriert (es zeigte

[1] Es ist auch nicht unmoglich, daß das schwache Wachstum, welches auf dem normalerweise benutzten Pepton- und Leitungswasseragar auftritt, durch vitaminartige Stoffe des Agaragars selbst verursacht wird. — [2] Siehe *F. W. Went*, Recueil des travaux botaniques néerlandais **25**, 1, 1927.

sich, daß das Filtrat 7,2 mg organische Stoffe im Kubikzentimeter enthielt), und es wurde zu der erhaltenen bakterienfreien Flüssigkeit in Fraktionen soviel Phosphorwolframsäure (PWS.) zugefugt, bis weitere Zufügung keinen Niederschlag mehr entstehen ließ (es zeigte sich, daß diese Menge 25,5 ccm PWS. war). Darauf wurde scharf abfiltriert, mit 5 %iger H_2SO_4 ausgewaschen, der Niederschlag noch einige Male mit 5 %iger H_2SO_4 geschüttelt und noch einmal abfiltriert. Zu dem Filtrat wurde $Ba(OH)_2$ gefugt, um den Überschuß PWS zu entfernen, und darauf wieder abfiltriert. Dieses letzte Filtrat wurde unter Luftverdünnung bei 60° C bis auf 20 ccm eingedampft und als A bezeichnet. Es ergab sich, daß es 1,5 mg organische Substanz in Kubikzentimeter enthielt.

Der PWS.-Niederschlag wurde in 35 % NaOH (tropfenweise zugefugt) gelost. Der Losung wurde ein Überschuß $Ba(OH)_2$ zugefugt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit H_2SO_4 schwach angesauert, worauf nochmals filtriert wurde Das erhaltene Filtrat wurde bis 26 ccm eingedampft und als B bezeichnet. Es ergab sich, daß es 2,4 mg organische Substanz in Kubikzentimeter enthielt.

In bekannter Weise wurden die Filtrate A und B hinsichtlich des Stammes *1244* untersucht

Filtrat A	Auf 1 % Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
1 ccm	sehr starkes Wachstum	maßiges Wachstum
0.1 „	starkes Wachstum	schwaches Wachstum
0,05 „	sehr gutes Wachstum	„ „
0,02 „	gutes Wachstum	„ „
0,01 „	„ „	„ „
0,005 „	ziemlich gutes Wachstum	„ „
0,002 „	maßiges Wachstum	„ „
0,001 „	maßiges bis schwaches Wachstum	„ „

Filtrat B	Auf 1 % Peptonagar	Auf Leitungswasseragar
1 ccm	starkes Wachstum	schwaches Wachstum
0,1 „	sehr gutes Wachstum	„ „
0,05 „	ziemlich gutes Wachstum	„ „
0,02 „	maßiges Wachstum	„ „
0,01 „	schwaches Wachstum	„ „

Aus obiger Übersicht folgt, daß Filtrat A wenigstens zehnmal so aktiv ist als Filtrat B, d. h daß das aktive Prinzip — in scharfem Widerspruch zu dem von *Hughes* (5) studierten *Staphylokokken*-Stimulans — von PWS. nicht oder doch nur wenig gefällt wird; nur die stark absorbierende Wirkung derartiger voluminöser Niederschläge dürfte daran schuld sein, daß Filtrat B nicht ganz inaktiv war.

0,001 ccm vom Filtrat A (das 1,5 mg organische Substanz im Kubikzentimeter enthält) übt in 30 ccm 1 %igem Peptonagar noch eine merkbar stimulierende Wirkung aus. In einer derartigen Platte sind 0,0015 mg des aktiven Prinzips anwesend, also je Kubikzentimeter oder Gramm des Nährbodens 0,00005 mg. Da hierin 10 mg Pepton anwesend sind, wird das Verhältnis von Stimulans zum Dissimilationssubstrat 1 : 5000000. Wenn man noch in Betracht zieht, daß das Prinzip bei obigen Behandlungen gar nicht rein sein kann, so ist wohl zweifellos, daß es eine vitaminartige Natur haben muß.

Es scheint mir am Platze, dem hier zum ersten Male beschriebenen, für vitaminartige Stoffe empfindlichen Bakterium zum Andenken an den großen Entdecker der Vitamine, weiland Prof. Dr. *C. Eykman* in Utrecht, den Namen *Microc. Eykmanii* zu geben.

Am Ende dieser Abhandlung ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. *F. A. F. C. Went*, Herrn Dr. *H. G. van der Weij* und Herrn Dr. *W. Schut* für ihre so geschätzte Hilfe meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Zusammenfassung.

1. Das Wachstum eines, auf Peptonagar äußerst schwer wachsenden *Micrococcus*, *M. Eykmanii* genannt, wird von bestimmten Luftkeimkolonien in starkem Maße gefördert.

2. Mit Ausnahme von *Microc. albus* und *Microc. roseus* waren alle Stämme meiner Sammlung (Bakterien, Hefen, Schimmelpilze) imstande, das Wachstum von *Microc. Eykmanii* zu fördern.

3. Es gelang dagegen nicht, ein anderes Bakterium, dessen Wachstum in derselben Weise wie das von *Microc. Eykmanii* beeinflußt werden konnte, zu isolieren.

4. Stark verdünnte, sterile Filtrate von Kulturflüssigkeiten aktiver Stämme waren nur dann imstande, das Wachstum von *Microc. Eykmanii* zu fördern, wenn zu gleicher Zeit Pepton als Dissimilationsubstrat anwesend war. Ohne dieses Substrat war das Wachstum ebenso schlecht wie auf Peptonagar ohne Zufügung.

5. Stark verdünnte sterile Filtrate von Pflanzenextrakten (Kartoffel- und Malzextrakt, Zitronen- und Apfelsinensaft) sowie tierische Flüssigkeiten (Harn, Fleischextrakt) übten ebenfalls einen das Wachstum fördernden Einfluß auf *Microc. Eykmanii* aus.

6. Erhitzen der Filtrate, sogar 20 Minuten auf 120° C, übte keinen störenden Einfluß auf ihre Aktivität aus.

7. Die meisten Peptonfabrikate enthalten selbst schon das Wachstumsstimulans. Es stellte sich heraus, daß nur das zu diesen Experi-

menten benutzte Pepton *Poulenc* pulvérisée eines der wenigen Peptone ist, die diesen Stoff nicht enthalten.

8. Das hier untersuchte Stimulans ist nicht identisch mit den Auxinen.

9. Ein Teil vom Stimulans auf 5000000 Teile Dissimilationsubstrat war noch imstande das Wachstum von *Microc. Eykmanii* zu fördern.

Literatur.

1) *R. Grassberger*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **25**, 453, 1897; s. auch *A. L. Sergent*, Les facteurs de Croissance des Microbes, Paris 1928. — 2) *D. J. Davis*, J. Infect. Dis. **21**, 392, 1917. — 3) *A. Bokalo*, *S. Wedischtschew*, *A. Sabanin*, *A. Jegorow* u. *W. Grikurow*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **125**, 32, 1932. — 4) *N. L. Sohngen*, Versl. Akad. Wetensch. Amsterdam **36**, 1281, 1927. — 5) *Th. P. Hughes*, J. Bact. **23**, 437, 1932. — 6) *C. H. Werkman*, ebenda **14**, 335, 1927.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

Lassen sich Beziehungen zwischen Kohlenhydratbildung und Knöllchen bei Leguminosen feststellen?

Von

August Rippel und **Walter Krause.**

(Eingegangen am 3. August 1933.)

So sicher wir wissen, daß sich bei der Knöllchenbakterien-Symbiose der Leguminosen eine Bindung des elementaren Luftstickstoffs vollzieht, so wenig wissen wir über den Vorgang im einzelnen. Zwar müssen wir ihn der Tätigkeit der Bakterien zuschreiben; die älteren Anschauungen, wonach die Bakterien nur einen Reiz ausüben, die N-Bindung aber durch die Pflanze selbst erfolge, konnten sich nicht halten. Wenn neuerdings *Vita* behauptet, daß in keimenden Leguminosen-Samen unter gewissen Bedingungen eine N-Bindung stattfände, so können die Versuche, bei denen keine Kontrolle mit Nicht-Leguminosen vorliegt, zudem nur Prozentzahlen an Stickstoff in der Trockensubstanz mitgeteilt werden, keinerlei Anspruch auf Beweiskraft erheben. Alle Beobachtungen deuten allerdings darauf hin, daß ein enges Zusammenleben zwischen Bakterien und Leguminosen in dieser Hinsicht entscheidend ist.

Es konnte nämlich bisher noch keine N-Bindung bei Reinkulturen der Bakterien nachgewiesen werden, und diesbezügliche positive Angaben erwiesen sich als methodisch nicht einwandfrei, wie insbesondere *M. P. Löhnis* zeigte. *Wilson-Hopkins-Fred* konnten bei allen wesentlichen gründlichen Nachprüfungen, selbst bei Zugabe von sterilem, atmendem Pflanzengewebe, eine N-Bindung nicht feststellen. Auch wir haben gelegentlich der nachstehend zu schildernden Untersuchungen bei Reinkulturen von Erbsenbakterien unter erhöhtem Kohlenhydratgehalt des Substrats ein negatives Ergebnis gehabt.

Das ist immerhin auffallend, da einmal eine N-Bindung durch frei lebende N-bindende Formen leicht nachgewiesen werden kann, wenn auch nicht bei allen Stämmen, und andererseits die Symbiose zwischen Bakterien und Leguminose im Grunde genommen nicht allzu eng erscheint, wenn man die Tatsache, daß die Infektion der Leguminose mehr oder weniger zufällig sich vollzieht, in diesem Sinne deuten will.

Alle Beobachtungen weisen nun weiter darauf hin, daß die Versorgung der Bakterien seitens der Leguminose mit Kohlenhydraten einer der entscheidenden Faktoren sein muß, wie *Rippel-Poschenrieder* ausführten. Nicht nur der Stärkegehalt der Knöllchen und seine Änderungen, sondern auch theoretisch-energetische Betrachtungen deuten darauf hin. Die Anschauung von *Christiansen-Weniger*, wonach die Bakterien bei der N-Bindung Energie zu autotrophem Leben gewinnen sollen, erscheint jedenfalls wenig einleuchtend; sie wäre höchstens beim Vorhandensein von *freiem* Wasserstoff denkbar. Die Nichtberücksichtigung des Kohlenhydratfaktors mag auch mit der Grund sein, weshalb *Beijerinck* und *Wilson-Hopkins-Fred* in abgeschnittenen Knöllchen keine N-Bindung feststellen konnten. Aber auch diese Beziehungen sind experimentell noch nicht genügend erfaßt.

Einige weitere Beobachtungen liegen jedoch in dieser Richtung: *Golding* fand das Wachstum von Leguminosen durch Zuckerzusatz zum Boden gefördert. *Kostychew* stellte eine im Vergleich zu Gramineen doppelt so hohe Assimilationsleistung von Leguminosenblättern fest. *Reinau* und *Dönhoff* fanden im Leguminosenbestand eine wesentlich höhere CO_2-Produktion des Bodens gegenüber einem Gramineenbestand. Nach *Allam* sinkt bei Lichtentzug die N-Bindung der Leguminosen schneller ab als bei Belichtung. *Rüffer*, auf dessen Ergebnisse später noch zurückzukommen sein wird, fand bis zum „Hungerstadium" höheren Gehalt an Kohlenhydraten bei knöllchentragenden im Vergleich zu knöllchenfreien Pflanzen. *Wilson-Fred-Salmon* stellten unter gewissen Bedingungen Vermehrung der Knöllchenbildung und der Stickstoffbindung bei Leguminosen unter erhöhter Zufuhr von Kohlensäure fest. *Schweizer* endlich teilt in einer kurzen Notiz mit, daß etiolierte Leguminosen-Pflanzen und weiße Varietäten keine Knöllchen bilden, wohl aber beim Begießen mit Zuckerlösung.

Um einen Beitrag zu dieser Frage zu liefern, verfolgten wir den Kohlenhydratgehalt von Leguminosenblättern (Erbsen) und von Haferblättern (als Testobjekt für eine nicht N-bindende Pflanze). Die Erbsen wurden teils mit den Wurzeln und ihren Knöllchen (bei gutem Besatz) der zu beschreibenden Behandlung unterzogen, teils in abgeschnittenem Zustande, um so die N Bindung anzuschalten. Das schien uns sicherer zu sein als die Heranziehung von Pflanzen, die mit gebundenem Stickstoff (zur Ausschaltung der Knöllchenbildung) versorgt waren. Denn abgesehen davon, daß vielleicht die Knöllchenbildung doch nicht ganz unterdrückt worden wäre, würde auch eine Nitraternährung Energie zur Nitratreduktion erfordern, bei einer Ammonsalzdüngung wäre aber wieder die Möglichkeit der Nitrifizierung gegeben gewesen, oder man hätte, falls diese nicht eingetreten wäre, mit veränderten Reaktionsbedingungen rechnen müssen. Der Hafer wurde natürlich entsprechend behandelt. Im übrigen gestalteten sich die Versuche folgendermaßen:

Wir führten zwei Versuche durch, den ersten vom 1. August 1930, den zweiten vom 29. Juni 1931 an, jeweils mit Erbsen und Hafer, die auf dem Versuchsfelde aufgezogen waren. Die Erbsen hatten gute Knöllchen gebildet. Beim ersten Versuch waren Hafer und Erbsen gleichzeitig im Beginn der Blüte, beim zweiten waren die Erbsen eben aufgeblüht, während der Hafer schon abgeblüht war. Es wurden nun je drei bis fünf Pflanzen

mit dem Erdballen vorsichtig ausgehoben und mit einem Erde-Wasser-Gemisch in größere Emaillegefäße eingeschlämmt. Weitere Pflanzen in gleicher Anzahl wurden abgeschnitten und in 500 ccm-*Erlenmeyer*-Kolben mit Leitungswasser gestellt. Die weitere Behandlung war nun folgende: An diesen Pflanzen wurde dann bei zwei Parallelen (Gruppe I der Tabellen) die Blattfläche bestimmt durch Kopieren der Blattspreiten auf Ozalidpapier, Ausschneiden und gewichtsmäßige Bestimmung der Fläche. Diese Bestimmung wurde sofort ausgeführt, und die Blätter kamen unmittelbar anschließend in den Trockenschrank bei 98° C, damit Verluste durch Atmung möglichst vermieden würden.

Die restlichen Pflanzen wurden nun abends $5^1/_2$ Uhr 60 Stunden im Brutzimmer bei völliger Dunkelheit aufgestellt, danach wurde wieder an je zwei Parallelproben die Blattfläche bestimmt und getrocknet (Gruppe II der Tabellen). Hierauf wurden die übrigen Pflanzen von morgens 4 Uhr bis abends voller Belichtung im Freien ausgesetzt und nunmehr die Gruppe III geerntet. Endlich kam die Gruppe IV dann nochmals 36 Stunden ins Dunkelzimmer und wurde danach geerntet.

In der getrockneten Blattmasse war bei mikroskopischer Prüfung (nach *Lode*) nur ein ganz minimaler Stärkegehalt festzustellen, vielleicht deshalb, weil die Stärke beim Welken und Trocknen (vgl. *Horn*) abgebaut war. Infolgedessen brauchte nur der Zuckergehalt bestimmt zu werden, und zwar vor und nach Inversion. Die Zuckerbestimmung wurde in der von *Lehmann* abgeänderten Weise nach *Hagedorn-Jensen* durchgeführt, weil wir mit sehr kleinen Mengen arbeiten mußten und andere Methoden mit zu großen Fehlern arbeiten. Bei Kontrollbestimmungen mit 0,1 und 0,2 mg Glucose und Saccharose, mit welcher Größenordnung wir zu rechnen hatten (die Methode arbeitet am besten bei Mengen von 0,08 bis 0,3 mg), ergab sich ein mittlerer Fehler von höchstens 3 %, so daß die Methode genügende Genauigkeit bietet. Der Analysengang gestaltete sich nun folgendermaßen:

0,5 g der feingepulverten absolut trockenen Blattsubstanz wurden mit der 100fachen Wassermenge unter Zusatz von etwas $BaCO_3$ (zur Abstumpfung der Pflanzensäuren) 5 Minuten gekocht, $^1/_2$ Stunde stehengelassen, abgenutscht, das Aufkochen mit der gleichen Wassermenge wiederholt, dann 12 Stunden stehengelassen, wieder abgenutscht, ein drittes Mal aufgekocht und nach halbstündigem Stehen abgenutscht. Die vereinigten Filtrate wurden mit einer Messerspitze „Carbo medicinalis *Merck*" versetzt, unter Umrühren aufgekocht, abfiltriert, heiß nachgewaschen, das Filtrat, bei saurer Reaktion, neutralisiert, auf 100 ccm aufgefüllt und in zwei gleiche Teile geteilt.

Die eine Hälfte diente zur direkten, die andere zur Zuckerbestimmung nach 5 Minuten dauernder Inversion bei 70° C mit 5 %iger HCl und nochmaliger Neutralisation. 1 bis 5 ccm der Lösung, je nach der Zuckerkonzentration, wurden mit 5 ccm n/500 Kaliumferricyanidlösung versetzt, 5 Tropfen 10 %ige Na_2CO_3-Lösung hinzugefügt, auf 14 ccm aufgefüllt und 15 Minuten im Wasserbad erhitzt. Hierauf wurden 3 ccm einer Lösung von 10 g $ZnSO_4$ + 50 g NaCl in 200 ccm Wasser, der vor Gebrauch 0,5 g KJ zu 20 ccm zugesetzt war, und schließlich 2 ccm 3 %ige Essigsäure hinzugefügt. Das ausgeschiedene Jod wurde nach Zusatz von 4 Tropfen Stärkelösung (1 %ig) mit n/200 Thiosulfatlösung titriert. Ferner wurde jeweils ein Blindversuch angestellt und der erhaltene Wert abgezogen. Die gefundenen Werte sind als Glucose berechnet (nach der Tabelle von *Rona*).

Tabelle I zeigt diese Zahlen und zwar jeweils das Mittel aus den beiden immer gut ubereinstimmenden Parallelen, ausgerechnet auf gleiche Fläche (1000 qcm Blattfläche). Die Blattfläche ergibt hier einen exakten Maßstab, da ja die Pflanzen von gleicher Vorbehandlung waren. Tabelle II gibt die Umrechnung in Relativwerten, den Anfangsgehalt = 100 gesetzt.

Tabelle I.

1000 qcm *Erbsen*blätter enthalten Milligramm Zucker.

Gruppe	I		II		III		IV	
	frisch untersucht		60 Std dunkel		Wiederbelichtung		wieder verdunkelt	
	vor Inversion	*nach Inversion*	vor Inversion	*nach Inversion*	vor Inversion	*nach Inversion*	vor Inversion	*nach Inversion*
Erbsen (1930) *mit* Wurzeln	92,0	*142,0*	13,9	*13,9*	86,2	*98,2*	59,9	*78,8*
Erbsen (1930) *ohne* Wurzeln	92,0	*142,0*	29,4	*47,9*	50,1	*51,5*	32,8	*32,8*
Erbsen (1931) *mit* Wurzeln	110,1	*145,0*	16,5	*17,3*	38,0	*38,3*	35,2	*35,5*
Erbsen (1931) *ohne* Wurzeln	110,1	*145,0*	24,3	*27,3*	21,8	*22,3*	23,9	*24,4*

1000 qcm *Hafer*blatter enthalten Milligramm Zucker

Gruppe	I		II		III		IV	
	frisch untersucht		60 Std dunkel		Wiederbelichtung		wieder verdunkelt	
	vor Inversion	*nach Inversion*	vor Inversion	*nach Inversion*	vor Inversion	*nach Inversion*	vor Inversion	*nach Inversion*
Hafer (1930) *mit* Wurzeln	124	*226,0*	60,7	*62,8*	41,7	*68,2*	22,0	*22,6*
Hafer (1930) *ohne* Wurzeln	124	*226,0*	75,0	*118,1*	90,9	*117,3*	28,2	*29,5*
Hafer (1931) *mit* Wurzeln	408,6	*515,1*	268,5	*271,8*	355,0	*361,9*	187,0	*189,4*
Hafer (1931) *ohne* Wurzeln	408,6	*515,1*	289,0	*297,3*	383,0	*399,2*	283,5	*285,1*

Die 60stundige Verdunkelung fuhrte naturlich in allen Fällen zu einer erheblichen Abnahme der Kohlenhydrate. Die Relativwerte der Tabelle II zeigen nun, daß die Pflanzen mit Wurzeln stärker an Kohlenhydraten verloren haben als die Pflanzen ohne Wurzeln. Insbesondere ist, wie Tabelle I zeigt, bei den Pflanzen mit Wurzeln der Rohrzucker verschwunden, der bei den Pflanzen ohne Wurzeln zum Teil erhalten geblieben ist. Weiterhin zeigt sich, daß die Abnahme bei Erbsen großer ist als bei Hafer. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, daß der Hafer im zweiten Jahre den Erbsen gegenuber einen besonders hohen,

etwa viermal so hohen, Kohlenhydratgehalt besitzt. Aber die Gehaltszahlen des ersten Jahres entsprechen einander fast völlig, so daß jener Unterschied in der Eigenheit der betreffenden Pflanzen begründet sein muß. Eine besondere Stellung der knöllchentragenden Erbsen läßt sich indessen nicht erkennen.

Tabelle II.

Relativzahlen des Kohlenhydratgehaltes (nach Inversion) für 1000 qcm Blattfläche.

Erbsen:

Gruppe:	I	II	III	IV
	frisch untersucht	60 Std. dunkel	Wieder-belichtung	wieder verdunkelt
Erbsen (1930) *mit* Wurzeln	100	9,79	69,1	55,5
Erbsen (1930) *ohne* Wurzeln	100	33,7	36,3	23,1
Erbsen (1931) *mit* Wurzeln	100	11,9	26,4	24,5
Erbsen (1931) *ohne* Wurzeln	100	19,0	15,4	16,8

Hafer:

Gruppe:	I	II	III	IV
	frisch untersucht	60 Std. dunkel	Wieder-belichtung	wieder verdunkelt
Hafer (1930) *mit* Wurzeln	100	27,8	30,1	10,0
Hafer (1930) *ohne* Wurzeln	100	52,2	51,8	13,1
Hafer (1931) *mit* Wurzeln	100	52,8	70,3	36,7
Hafer (1931) *ohne* Wurzeln	100	57,7	77,5	55,2

Bei der ersten Wiederbelichtung zeigt sich nun ein deutlicher Unterschied zwischen Erbsen und Hafer. In beiden Jahren haben die Erbsen mit Wurzeln (und Knöllchen) die abgeschnittenen Erbsen, deren Kohlenhydratgehalt weiter abgenommen hat, darin sehr stark uberholt, während beim Hafer die Wurzelpflanzen hinter den abgeschnittenen Pflanzen zurückblieben, den stärkeren Verlust während der Verdunkelung jedenfalls nicht wieder einzuholen vermochten. Diese Erscheinung ist gewiß recht auffallend; sie kann unserer Ansicht nach nur dadurch zustande kommen, daß die Leguminose bei Vorhandensein der Bakterien an den Wurzeln zu einer intensiveren Assimilation angeregt wird. Das würde also der Auffassung entsprechen, die oben schon angedeutet wurde, daß die N-

Bindung in der Bakterien-Leguminosen-Symbiose in recht enger gegenseitiger Beeinflussung der beiden Organismenbestandteile vor sich geht.

Rüffer fand höheren Kohlenhydratgehalt bei knöllchentragenden Pflanzen bis zum Hungerstadium im Vergleich zu knöllchenfreien, mit gebundenem Stickstoff ernährten, während sich später die Verhältnisse umdrehten. Bei anderen Versuchen handelt es sich um Pflanzen von vorgerücktem Alter; man hätte also bei der Wiederbelichtung das gegenteilige Ergebnis erwarten sollen. Gerade jedoch weil dies nicht der Fall war, scheinen uns die mitgeteilten Versuche für eine Beeinflussung der Pflanze durch die Bakterien zu sprechen. Möglicherweise sind die Ergebnisse von *Rüffer* folgendermaßen zu erklären: Der höhere Kohlenhydratgehalt der Hungerpflanzen braucht nicht unbedingt mit der Bakterientätigkeit zusammenzuhängen, sondern kann dadurch bedingt sein, daß die im Vergleich zu den knollchenfreien Pflanzen verminderte Substanzproduktion eben die Kohlenhydratreserven nicht so stark angreift. Es ist durchaus denkbar, daß später, wie *Ruffer* meint, bei seinen Versuchen die erhöhte Assimilationstätigkeit der Pflanze bei Gegenwart der Bakterien durch eine schnellere Ableitung, bei gleichfalls erhöhtem Verbrauch, verdeckt wird. Wenn das bei unseren Versuchen nicht eingetreten ist, so kann das möglicherweise auf die Störung infolge der vorangegangenen Verdunkelung zuruckzuführen sein. Es müßte vielleicht erst eine gewisse „Auffüllung" an Kohlenhydratreserven stattfinden, bevor die normale Ableitung wieder in Tätigkeit treten könnte. Indessen durften die Verhältnisse so kompliziert liegen, daß ohne eine sehr verbreiterte experimentelle Basis kaum etwas Bestimmtes ausgesagt werden kann, eine weitere Erörterung scheint uns daher einstweilen wenig fruchtbar zu sein.

Die zweiter Verdunkelung (Gruppe IV der Tabellen) hat bei den Erbsen zwar noch ein Sinken des Kohlenhydratgehaltes zur Folge, das aber verhältnismäßig gering ist, während beim Hafer eine sehr starke Abnahme erfolgt. Bezogen auf die Werte der Gruppe III stellen sich die Zahlen der Gruppe IV folgendermaßen (nach Inversion):

Erbsen				Hafer			
1930		1931		1930		1931	
mit Wurzeln	ohne Wurzeln	mit Wurzeln	ohne Wurzeln	mit Wurzeln	ohne Wurzeln	mit Wurzeln	ohne Wurzeln
80,2	63,7	92,6	(100)	33,1	25,1	52,3	71,5

Das ist wohl nur so zu erklären, daß die lichtbedürftige Leguminose durch die zweite Verdunkelung schwer, jedenfalls schwerer geschädigt wurde als der Hafer. Ein Zusammenhang mit den Bakterien ist hier kaum zu erkennen. Es könnte höchstens vermutet werden, daß diese

einer geschädigten Pflanze die Kohlenhydrate nicht mehr zu entziehen vermögen, was dann ebenfalls für das oben erwähnte enge Zusammenarbeiten beider Organismen sprechen würde.

Wir führten weiterhin eine Analyse der Knöllchen aus, die folgendes ergab:

In % der Trockensubstanz		In % der Trockensubstanz		In % der Asche	
Rohfett	1,83	CaO	0,62	CaO	11,64
Rohfaser	1,44	MgO	0,25	MgO	4,54
Roheiweiß	32,25	K_2O	1,31	K_2O	24,25
Reineiweiß	27,38	Na_2O	0,84	Na_2O	15,70
Pepton	0,91	SO_3	0,88	SO_3	16,44
NH_3-Stickstoff	0,062	P_2O_5	1,13	P_2O_5	21,15
Löslicher Zucker	0,64				
Stärke	2,40				
Asche	5,35				

Hierzu sei noch bemerkt, daß sich in der Asche 54 % Sand + Kieselsäure, 1,25 % Fe_2O_3 und 2,52 % Al_2O_3 befanden, die zweifellos zum allergrößten Teil von Verunreinigungen mit Boden herrührten. Die obigen Zahlen sind daher nach Abzug dieser Mengen berechnet. Zucker wurde bestimmt, wie oben angegeben ist, Stärke direkt nach dem Verfahren von *v. Fellenberg*.

Die Werte für die anorganischen Stoffe stimmen mit den älteren von *Troschke* angegebenen gut überein; wie zu erwarten war, bilden, vom mehr zufälligen Na-Gehalt abgesehen, Kalium und Phosphor die Hauptbestandteile der Asche; doch ist auch der Schwefelgehalt ziemlich hoch.

Uns interessierten mehr die organischen Stoffgruppen, insbesondere die stickstofffreien Gruppen. Hier ist nun sehr auffallend der außerordentlich niedrige Gehalt an „Rohfaser"; es handelt sich nicht um einen Analysenfehler, da der Wert eigens kontrolliert wurde. Fett[1], Rohfaser, Roheiweiß, Zucker, Stärke und Asche ergeben zusammen nur 43,9 % der Trockenmasse. Es müssen also in den Knöllchen offenbar sehr große Mengen leicht abbaubarer Stoffe von Nichtstärke-Natur vorhanden sein. In dieser Richtung haben wir einige orientierende Versuche angestellt.

Eine Hydrolyse von 5 g Substanz mit 100 ccm 1,5 %iger Salzsäure, 2 Stunden am Rückflußkühler, ergab 8,96 % reduzierenden Zucker als Glucose berechnet. Nach Abzug der festgestellten 3,04 % Zucker + Stärke verbleiben demnach 5,92 % reduzierende Zucker (als Glucose berechnet), die nicht aus Zucker und Stärke stammen. Eine stärkere Hydrolyse, wobei mit gleichen Mengen 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht wurde, ergab eine etwas höhere Zahl, nämlich 10,17 % reduzierenden Zucker, als Glucose

Rewald-Riede fanden in *Soja*-Knöllchen 1,60 % Ätherextrakt.

berechnet, so daß 7,13 % verbleiben, die nicht aus Zucker und Stärke stammen. Der Rückstand dieser Hydrolyse wurde nochmals 6 Stunden ebenso gekocht, ergab aber keinen reduzierenden Zucker mehr. Der Rückstand betrug 17,12 % der Trockensubstanz, darin 5,85 % Asche, die wohl aus Sand bestand. Eine noch stärkere Hydrolyse, 2 Stunden mit 5 %iger HCl hatte bereits weniger Zucker zur Folge, da dieser offenbar zum Teil zerstört wurde.

Wiederholte Extraktion mit Alkohol ergab 8,45 % Extrakt, dessen Trockensubstanz 4,56 % Stickstoff enthielt; nimmt man diesen als Eiweiß an, so würden 6,05 % N-freie Substanzen verbleiben. Der Rückstand dieser Extraktion (ursprünglich 5 g) wurde dreimal mit je 50 ccm Wasser ausgekocht und das Filtrat mit Alkohol versetzt; die Fällung betrug 9,98 %, auf Ausgangstrockensubstanz berechnet; die Fällung enthält 1,83 %* Stickstoff, also verbleiben 8,85 % N-freie Substanzen (N × 6,25), jedenfalls erheblich mehr als dem Stärkegehalt entspricht. Es handelt sich hier offenbar um gummiartige oder schleimige Stoffe. 49,4 % dieses N-freien Niederschlags fanden sich bei Hydrolyse durch 1,5 %ige HCl als reduzierender Zucker. Der Extrakt der Alkoholfällung ergab eingedampft 11,54 % aschefreie Substanz (bezogen auf Ausgangstrockensubstanz).

1 g Substanz, mit 100 ccm Wasser 1 Stunde am Rückflußkühler gekocht, ergab einen Rückstand von 72,76 %, der bei Hydrolyse 2,60 % reduzierenden Zucker ergab (auf ursprüngliche Substanz berechnet), während im hydrolysierten Filtrat 7,30 % Zucker, in gleicher Weise berechnet, gefunden wurden.

Eine nach Verzuckerung mit Ptyalin (Speichel) vorgenommene Stärkebestimmung als Kontrolle obiger Bestimmung ergab 3,72 %, als Maltose berechnet; nach Abzug der ursprünglich vorhandenen Zuckermenge von 0,64 % verbleiben also 3,08 % Stärke, was einigermaßen gut mit unserer obigen Zahl übereinstimmt, wenn man bedenkt, daß die Annahme von reiner Maltose reichlich unsicher sein dürfte. Jedenfalls sollte die Kontrolle zeigen, daß in der Stärkebestimmung kein wesentlicher Fehler vorliegen kann.

Endlich wurden 1 g Substanz zuerst in der Kälte, dann in der Hitze mit 1 %iger Natronlauge behandelt, wobei ein Rückstand von 27,26 % gefunden wurde, der nur 0,91 % Stickstoff enthielt*; es verbleiben somit 25,70 % N-freier Rückstand, wenn der Stickstoff als Eiweiß angenommen wird.

Zusammenfassend zeigen diese Zahlen, daß einerseits eine gewisse Menge von leicht aufspaltbaren Polysacchariden in den Knöllchen vorhanden ist, Gummi- oder Schleimstoffe, Hemicellulosen usw., daß aber ein sehr großer Teil der Trockenmasse (etwa 1/3) aus Substanzen besteht, welche bei der Rohfaserbestimmung gelöst, aber durch einfache Laugekochung nicht völlig in Lösung gebracht werden. Sie sind jedenfalls nicht leicht hydrolysierbar. Diese Stoffe sind wahrscheinlich N-frei; denn der geringe N-Gehalt des Rückstandes der Laugebehand-

* Mit Ausnahme der N-Zahlen, die den Prozentgehalt in der untersuchten Fällungs- bzw. Rückstandsmenge angeben, beziehen sich alle Zahlen auf die ursprüngliche Pflanzensubstanz.

lung ist mit ziemlicher Sicherheit auf ungelöste Eiweißstoffe zurückzuführen. Welcher Natur jedoch diese Stoffe sind, ob es sich um Polysaccharide handelt, vermögen wir einstweilen nicht zu sagen, auch nicht, ob sie Produkte der Pflanze oder der Bakterien sind, noch auch, ob sie mit der Stickstoffbindung in irgendeinem Zusammenhang stehen[1]. Es sei noch darauf hingewiesen, daß nach *Georgi-Wilson* von den Bakterien reichlich gummiartige Stoffe gebildet werden, was im Gasstoffwechsel deutlich zum Ausdruck kommt. Ob diese mit den fraglichen Stoffen in den Knöllchen in irgendeinem Zusammenhang stehen, vermögen wir nicht zu sagen, wenn auch vielleicht anzunehmen wäre, daß sie leicht hydrolysierbar sein müßten.

Zusammenfassung.

In nach Verdunkelung wiederbelichteten Erbsen findet stärkere Anhäufung an Kohlenhydraten statt, wenn die Pflanzen Wurzeln mit Knöllchen besaßen, verglichen mit abgeschnittenen Pflanzen: entsprechend behandelter Hafer zeigt die Erscheinung nicht. Diese Beobachtung scheint auf die engen Wechselbeziehungen zwischen Bakterien und Pflanze und ihre Bedeutung für die Stickstoffbindung hinzudeuten.

In den Knöllchen finden sich bis zu etwa $^1/_3$ der Trockensubstanz N-freie Stoffe, die nicht oder nur sehr schwer bei Hydrolyse Zucker geben, und deren Natur noch nicht festzustellen war.

Literatur.

F. Allam, Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Düngung (A) **20**, 270, 1931.

M. W. Beijerinck, Proc. Sect. Sci. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam **21**, 183, 1918.

F. Christiansen-Weniger, Centralbl. f. Bakt. II, **58**, 41, 1923.

G. Dönhoff, Kühn-Archiv **15**, 457, 1927.

Th. v. Fellenberg, Zeitschr. f. Unters. d. Lebensm. **55**, 473, 1928. — *E. B. Fred*, *J. L. Baldwin* u. *E. McCoy*, Root nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin, Studies in Science Nr. 5, Madison, 1932.

C. E. Georgi u. *P. W. Wilson*, Arch. f. Mikrobiol. **4**, 543, 1933. — *J. Golding*, J. Soc. chem. ind. **18**, Nr. 6, 1899; **19**, Nr. 4, 1900; ref. Centralbl. f. Bakt. II, **9**, 251, 1902.

Th. Horn, Bot. Arch. **8**, 137, 1923.

S. Kostychew, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **40**, 112, 1922.

O. Lehmann, Planta **18**, 575, 1931. — *A. Lode*, Bot. Arch. **8**, 449, 1924. — *M. P. Löhnis*, Soil Sc. **29**, 37, 1930.

[1] Da unser Material an Knöllchensubstanz zu Ende war, konnten die Untersuchungen einstweilen nicht weiter fortgesetzt werden.

E. H. Reinau, Die Technik in der Landwirtschaft, S. 95, 182, 1924. — Fortschr. d. Landw. **1**, 787, 1926. — *B. Rewald* u. *W. Riede*, Biochem. Zeitschr. **247**, 424, 1932. — *A. Rippel* u. *H. Poschenrieder*, J. f. Landw. **76**, 101, 1928. — *P. Rohna*, Prakt. d. physiol. Chem. Teil I, Berlin, J. Springer, 1926. — *E. Rüffer*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung u. Düngung (A) **24**, 129, 1932.

J. Schweizer, Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **118**, 376, 1932.

Troschke, Wochenschr. pommersch. ökonom. Ges. Nr. 19, 125, 1884;, ref. Biedermanns Centralbl. **18**, 850, 1884.

N. Vita, Biochem. Zeitschr. **245**, 210, 1932; **252**, 278, 1932. — *N. Vita* u. *R. Sandrinelli*, ebenda **255**, 278, 1932.

P. W Wilson, E. W. Hopkins u. *E. B. Fred*, Arch. f. Mikrobiol. **3**, 322. 1931. — *P. W. Wilson, E. B. Fred* u. *M. R. Salmon*, Soil Sc. **35**, 45, 1933.

(Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

Untersuchungen an Actinomyceten.

Von

August Rippel und Paul Witter.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. August 1933.)

Material. Wir isolierten folgende fünf Stämme: *A I* aus Roggenstoppel des Göttinger Versuchsfeldes. Reichliche, rein weiße Luftsporen; schwache Säurebildung auf Ca-Malatagar, den Umfang der Kolonie um 0,5 cm übertreffend; glattes Wachstum; Ausscheidung eines braunen Farbstoffes auf Hefewasseragar; erdiger Geruch.

A II aus Fichtentrockentorf des Hils. Rötliche Sporen; sehr schwache Säurebildung auf Ca-Malatagar, den Umfang der Kolonie kaum übertreffend; knorpelig faltiges Wachstum; modriger Geruch.

A III aus Buchenwaldboden des Hils. Reichliche, graugrüne, heller oder dunkler schattierte Sporen; starke Säurebildung auf Ca-Malatagar, den Umfang der Kolonie um 1 cm übertreffend; ausgeprägte Hexenringbildung; Tropfenausscheidung der Kolonie; oberflächliches und sehr schnelles Wachstum; modriger Geruch.

A IV aus Luftinfektion. Graue, spärliche Sporen; Säurebildung wie bei *A III*; sehr langsames, etwas in den Agar eindringendes Wachstum; schwach würziger Geruch.

A V aus Erde eines Erdbeerbeetes. Kreidig weiße Sporen; Säurebildung dem Umfang der Kolonie entsprechend; langsames knorpeliges Wachstum; Tropfenausscheidung; erdiger Geruch.

Alle Stämme waren aerob und gehörten dem langfädigen Typus an.

Variabilität. Der gegenwärtige Stand der Variabilitätsfrage bei den *Actinomyceten* wurde kürzlich von Frl. *Tempel* (dort auch ausführliche Literatur) eingehend behandelt, wobei allerdings die namentlich von *Lieske* beschriebenen Abänderungen weder spontan noch durch experimentellen Eingriff erhalten werden konnten. Soeben teilt *Duché* mit, daß er ebenfalls keine Variation beobachten konnte; er hält die *Actinomyceten* für Klone mit festen Eigenschaften und glaubt, daß eine Variabilität durch Vermischung und spätere Trennung verschiedener

Stämme vorgetäuscht werde, weshalb er Einzellkulturen für unbedingt notwendig hält.

Unsere Untersuchungen setzten etwa gleichzeitig mit denen von *Tempel* ein, verzögerten sich jedoch durch Krankheit des einen von uns (*Witter*). Spontan erhielten wir einmal auf Hefewasseragar bei Stamm *A I* die von *Lieske* beschriebenen scharf abgesetzten, sporenlosen Sektoren, wobei die Kolonie deren fünf zeigte, die alle zu gleicher Zeit entstanden (Abb. 1). Bei Abimpfen von den sporenlosen und sporenführenden Teilen erhielten wir indessen wieder nur die normale sporentragende Form. Wir möchten noch auf folgende Erscheinung aufmerksam machen: Bei dem Stamm *A III* mit starker Hexenringbildung finden sich „Verwerfungen" so, daß bei scharf abgesetzten Sektoren die Ringe gegeneinander verschoben sind, ein sporenloser also gegen einen sporentragenden stößt (Abb. 2). Ob diese



Abb. 1.
Sektorenbildung bei *Actinomyces*.
Normale Größe.



Abb. 2.
Verwerfung bei einem Hexenringe bildenden Stamm von *Actinomyces*. Auf 2/3 verkleinert.

Erscheinung mit der vorher erwähnten Sektorenbildung irgend etwas zu tun hat, vermögen wir nicht zu sagen.

Im übrigen erhielten wir jedoch lediglich durch Außenbedingungen (Konzentration der Nährlösung, Agarkonzentration) ausgelöste Modifikationen in Sporenbildung, Koloniefarbe, Kolonieform, Geruchsbildung, Ringbildung, welche Merkmale unter gleichen Bedingungen aber stets konstant waren. Sonstige Eigenschaften, wie Langfädigkeit unserer Stämme und aerobes Wachstum, blieben konstant; eine Anpassung an Sauerstoffentzug trat nicht ein.

Wir versuchten weiter, durch Bestrahlung Abänderungen zu erzielen. Eine Röntgenbestrahlung wurde folgendermaßen durchgeführt: 23 Kilovolt, 21 Milliampere, Eisenstrahlung ohne Filterung, Abstand von der Kathode 25 bzw. 12,5 cm, Bestrahlungsdauer 2 Minuten; nach Abimpfung wieder 2 Minuten, nach nochmaliger Abimpfung nochmals 20 Minuten bei 25 cm Abstand, darauf wieder Abimpfung. Danach wurde der Abstand auf 12,5 cm verkürzt, nochmals 3 Minuten bestrahlt, abgeimpft und diese Bestrahlung wiederholt und wieder abgeimpft. Bei allen Abimpfungen wuchs der Organismus normal, auch in der zweiten und dritten Generation. Auch *Lieske* hatte (S. 108) mit Röntgenbestrahlung keinen Erfolg. Ebensowenig hatte eine Ultraviolettbestrahlung mit der Analysenquarzlampe (29 cm Abstand, keine Filterung, Staffelung von 1 bis zu 60 Minuten Bestrahlungsdauer) Erfolg.

Wir beschäftigten uns nun weiterhin mit einigen physiologischen, cytologischen und chemischen Eigenschaften.

Kohlenstoff- und Stickstoffquelle (Stammlösung nach *Braun*): Gute C-Quellen waren Glucose, Stärke, Glycerin, Calciummalat. Cellulose wurde weder in gefällter Form, obiger Nährlösung zugesetzt, noch auch in Form von Filtrierpapierscheiben nach *Krainsky* verwertet. Gute N-Quellen waren $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, Asparagin, Pepton, Glykokoll. Die drei letztgenannten Stoffe konnten gleichzeitig als C- und N-Quelle dienen.

Involutionsformen. Die von *Lieske* und *Munter* beschriebenen Involutionsformen haben wir ebenfalls aufgefunden; sie traten in 2 bis 3 Monaten alten Flüssigkeitskulturen bei Zusatz von 5 bis 7 % NH_4Cl auf, welcher Zusatz nach *Lieske* die Bildung befördert, ferner auch in 4 bis 5 Monate alten Flüssigkeitskulturen ohne Zusatz von NH_4Cl. Bei Zusatz von Lithiumchlorid (bis zu 0,5 %) traten keine „Reizformen“ auf. Färbung mit α-Naphtholblau, Sudan 3, Carbolfuchsin zeigte in den Involutionsformen 3 bis 4 kleine oder eine große Kugel, die als Fett anzusprechen sind, was auch weiter durch die Tatsache belegt wird, daß diese Inhaltsstoffe nach längerer Aufbewahrung in Äther verschwinden. Die Bildung der Involutionsformen muß demnach von einer Art fettiger Degeneration begleitet sein. Abb. 3 zeigt die Involutionsformen mit dem Fett.

Fett. Das Vorkommen von Fett in *Actinomyceten* wird bereits von *Lieske* (S. 88) angedeutet. Es findet sich nicht nur in den Involutionsformen, sondern auch im normalen Mycel, wenn jene fehlen, wie durch die genannten Färbungen nachgewiesen wurde. Wir gewannen von Stamm *A III*, 8 bis 10 Wochen alt, 12 g Mycel, das frei von Involutionsformen war, auf einer 2,5% lösliche Stärke, 0,6% KNO_3 und 0,3%



Abb. 3.
Fett in Involutionsformen von *Actinomyces* α-Naphtholfärbung. Vergrößert 720 mal.

K_2HPO_4 enthaltenden, mit NaOH auf p_H 7,4 gebrachten, mit destilliertem Wasser bereiteten Nahrlosung; das Mycel wurde dreimal je 6 Stunden mit Äther extrahiert Dabei ergab im Exsikkator getrocknetes Mycel bessere Ausbeute als solches, das im Trockenschrank bei 100° getrocknet wurde, vielleicht weil das Fett im letzten Falle schmilzt, das Mycel einheitlich durchtränkt und dann schwerer herausgelöst werden kann, oder weil die Durchlassigkeit der Membran für Äther verschieden beeinflußt wird

Es wurden 0,38‰ der Trockensubstanz an Fett gefunden. Dieses war unloslich in Alkohol, hatte einen Schmelzpunkt von etwa 19° C, eine Molekularrefraktion im *Zeiss*schen Butterrefraktometer von 52° bei 40° C Ein Teil war verseifbar. Gegen Lackmus reagierte es sauer, durch Wasserdampf ließen sich fluchtige Fettsäuren uberdestillieren. Es ist jedoch ungewiß, ob diese schon von vornherein im Mycel vorhanden waren oder während des Trocknens abgespalten wurden. Es ist aber jedenfalls normales Fett makrochemisch nachgewiesen.

Geruchstoffe. Die Geruchstoffe gehen in die Ätherfraktion uber, verschwinden aber nach einstundigem Erhitzen auf dem Wasserbade.

Volutin. Merkwürdigerweise ist dieser Inhaltstoff bis auf eine Vermutung von *Lieske* (S. 60, 88) noch nicht beachtet worden. Wir fanden ihn zunächst bei dem erwähnten Lithiumzusatz, wo er allerdings in höheren Konzentrationen nicht mehr auftritt, weiterhin aber in allen normalen Kulturen, und zwar in großen Mengen, wie Abb. 4 zeigt. Alle Reaktionen deuten auf Volutin: Löslichkeit in warmem Wasser sowie in 5 %igen Säuren und Alkalien, intensiv färbbar mit Fuchsin, Methylviolett, Methylenblau. Die Methylenblaufärbung ist gegen 1 %ige H_2SO_4 beständig, während das Plasma entfärbt wird. Jodjodkalium färbt gelb, die Färbung verschwindet beim Erwärmen und tritt beim Erkalten wieder auf. Zusatz von Jodjodkalium zur Methylenblaufärbung nach H_2SO_4-Behandlung gibt Schwarzfärbung. Auch bei zwei Stämmen, die wir kurz vor Abschluß dieser Arbeit durch Herrn Dr. *Nissen* von Herrn Prof. *Waksman* erhielten (*A. violaceus ruber Waksm. et Curtius* und *A. scapies Thaxter*) fanden wir ebenso Volutin wie in allen unseren Stämmen.

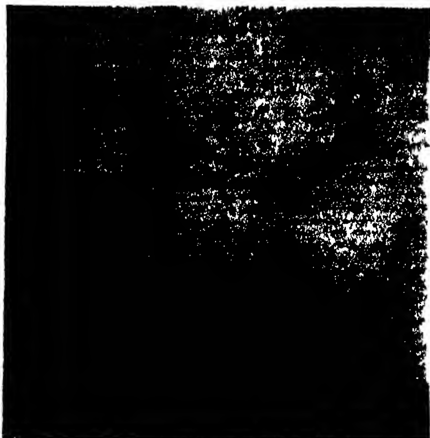


Abb. 4.
Volutin in *Actinomyces*. Methylenblau-Schwefelsäure. Vergrößert 720 mal.

Auf dem erwähnten Stärkeagar findet sich bei etwa 30° C nach 10 Tagen Volutin, nach weiteren 8 Tagen daneben Fett, das von da an immer mehr zunimmt, offenbar auf Kosten des gleichzeitig verschwindenden Volutins, das schließlich nicht mehr nachweisbar ist.

Zellkern. Die Frage eines Zellkerns muß zunächst im Anschluß an das Vorkommen von Fett besprochen werden. Es handelt sich um mit Methylenblau färbbare, bei Nachbehandlung mit H_2SO_4 sich entfärbende Körnchen, die also kein Volutin darstellen, und bei denen die Möglichkeit der Kernnatur erörtert wurde, ohne daß man bisher zu einer gesicherten Vorstellung kam (vgl. zuletzt *Tempel*). *Sartori-Meyer-Antinioli* wollen sogar mit der von ihnen modifizierten *Schumacher*-Färbung Kerne und deren sexuelles Verhalten bei *Actinomyceten* festgestellt haben, Angaben, die schon wegen der Kleinheit der Objekte sehr unwahrscheinlich sind, wenn man von der Unspezifizität der Färbung ganz absieht.

Uns scheinen die fraglichen Körnchen mit Fett identisch zu sein. Wir fanden sie in älteren, zum Teil erst in 4 Wochen alten Kulturen.

Auch *Lieske* hebt S. 83 hervor, daß sie am besten in älteren Kulturen aufzufinden waren, in denen ja, wie wir gesehen haben, Fett das Volutin ablöst. Sie verschwinden bei längerem Liegen des Mycels in Äther. Bei Methylenblaufärbung scheint uns eine Färbung der Körnchen vorgetäuscht zu werden. Eine ganz schwache Plasmafärbung läßt nämlich auch Inhaltstoffe anderer Lichtbrechung deutlich blau erscheinen. Öffnet man jedoch die Blende so weit, daß die sonstigen Strukturen der Fäden verschwinden, so verschwinden auch die Körnchen, während sie bei den Fettfärbungen in diesem Falle sichtbar bleiben.

Wir verwendeten nun auch die *Feulgen*sche Nuclealreaktion, wobei wir 6 bis 8 Minuten bei 60° C mit n HCl hydrolysierten, 4 Stunden mit fuchsinschwefliger Säure behandelten, mindestens $^1/_2$ Stunde in dauernd gewechseltem SO_2-haltigen Wasser auswuschen, dann in Leitungswasser überführten. Wir fanden kein morphologisch unterscheidbares Gebilde, das man als Kern hätte ansprechen können, sondern höchstens eine homogen-diffuse Anfärbung des ganzen Plasmas, wie sie *Pietschmann-Rippel* bei Bakterien gefunden haben, die aber etwas unsicher ausfiel. In solchen Präparaten war das Fett übrigens noch nachzuweisen[1]. Doch erfordert die Kernfrage noch eine besondere gründliche weitere Bearbeitung, da der unsichere Ausfall der Färbung noch keinen bindenden Schluß zuläßt. Auch konnte in den Involutionsformen keine Entmischung wie bei „Reizformen" der Bakterien festgestellt werden.

Chitin. Die mikroskopische Untersuchung auf Chitin hatte ein wenig eindeutiges Ergebnis, weshalb wir seinen Nachweis auf makrochemischem Wege versuchten. Dazu verwendeten wir die 12 g des zur Fettextraktion benutzten Mycels und die Methode, die *Behr* bei *Aspergillus* anwendete. Das Ergebnis war, daß alles restlos in Lösung ging bis auf einige leicht identifizierbare Cellulosefäserchen von den Watteverschlüssen der Kulturkölbchen. Chitin ist also in der Membran der *Actinomyceten* nicht enthalten, was vielleicht für ihre nähere Verwandtschaft zu den Bakterien (insbesondere nach vielfacher Annahme den *Mycobakterien*) als zu den Pilzen spricht (vgl. *F. v. Wettstein*).

Zusammenfassung.

Variabilität konnte bei einigen *Actinomyceten*-Stämmen weder durch Änderung der Kulturbedingungen noch durch Röntgen- oder Ultraviolettbestrahlung erzielt werden. Doch traten einmal spontan sporenlose Sektoren auf, deren Abimpfung wieder normal wuchs.

[1] Nachträgliche Versuche bestätigten wieder den diffusen Ausfall der Reaktion. Schon makroskopisch unterscheidet sich *Actinomyceten*-Mycel, nach *Feulgen* gefärbt, durch die rote Farbe von fast farblos erscheinendem, mikroskopisch die Kernfärbung zeigendem Pilzmycel.

Jüngere Kulturen enthalten reichlich Volutin, in älteren verschwindet dieses und wird durch Fett abgelöst, das sich in den Involutionsformen besonders reichlich findet. Das Fett der normalen Fäden konnte außer durch Färbung auch makrochemisch nachgewiesen werden.

Ein Zellkern konnte mit der *Feulgen*-Reaktion nicht aufgefunden werden; es trat höchstens diffuse Färbung des Plasmas auf, doch sind die Versuche noch mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Jedenfalls sind die Gebilde, die bisher als Kerne in Betracht gezogen wurden, wahrscheinlich Fetttröpfchen.

Chitin konnte makrochemisch nicht nachgewiesen werden.

Literatur.

G. Behr, diese Zeitschr. **1**, 418, 1930. — *H. Braun*, *A. Stamatelakis* u. *S. Kondo*, Biochem. Zeitschr. **145**, 381, 1924. — *J. Duché*, C. r. Acad. Sc. Paris **196**, 128, 1933. — *A. Krainsky*, Centralbl. f. Bakt. II, **41**, 649, 1914. — *R. Lieske*, Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Leipzig 1921. — *F. Münter*, Centralbl. f. Bakt. II, **44**, 673, 1916. — *K. Pietschmann* u. *A. Rippel*, diese Zeitschr. **3**, 422, 1932. — *A. Sartori*, *R. Meyer* u. *M. Antinioli*, C. r. Acad. Sc. Paris **195**, 2156, 1932. — *E. Tempel*, diese Zeitschr. **2**, 40, 1931. — *F. v. Wettstein*, Sitz.-Ber. Akad. d. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, **130**, 3, 1921.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

Nährstoffwirkung und Giftwirkung bei Aspergillus niger.

Von

Georg Lohmann.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. August 1933.)

1. Einleitung.

Nährstoff und Gift sind Ausdrucksweisen des alltäglichen Sprachgebrauches, und die damit verbundenen Vorstellungen können unter Umständen recht verschieden sein. So wird sich der Giftbegriff eines Juristen von dem eines Hygienikers oder eines Physiologen oft wesentlich unterscheiden. Nährstoff bzw. Gift für eine Pflanze brauchen ferner nicht gleichzeitig Nährstoff bzw. Gift für das Tier zu sein, wie ja für den Nährstoff auf Grund der direkt entgegengesetzten physiologischen Tätigkeit des Tier- und Pflanzenorganismus nicht anders zu erwarten ist. Bei einer schärferen Umgrenzung der mit den beiden Ausdrücken Nährstoff und Gift verbundenen Vorstellungen ist in der vorliegenden Arbeit nur an ihre Wirkung auf die Pflanze gedacht.

Nehmen wir nun ein Lehrbuch der Tier- oder Pflanzenphysiologie oder eines der Düngerlehre zur Hand in der Absicht, uns über die genauere Begriffsbestimmung der Nährstoffeigenschaft möglichst eingehend zu unterrichten und um Merkmale zu finden, an Hand derer wir jederzeit für einen beliebigen Stoff feststellen können, ob wir es in einem gegebenen Falle mit einem Nährstoff oder Nichtnährstoff zu tun haben, so gelangen wir zu dem überraschenden Ergebnis, daß trotz der Wichtigkeit der Frage hierüber kaum irgendwo in solchen Büchern etwas zu finden ist. Ist die Nährstoffwirkung eines Elementes oder einer Verbindung derart sinnfällig, daß sich eine Definition gänzlich erübrigt? Das ist wohl kaum der Fall. Wenn wir aber trotzdem in Lehrbüchern nichts darüber finden, so müssen andere Gründe vorliegen. Wir haben nämlich ein Erkennungszeichen für die Nährstoffeigenschaft,

aber wohl verstanden nur ein einziges bis jetzt, das als Kriterium allerdings oft versagt und wirklich unanfechtbar bislang eigentlich überhaupt noch nicht anwendbar war. Nährstoffe oder Nährelemente sind nach *Pfeffer*, welcher Auffassung *Roberg* (26, S. 226) sich anschließt, dadurch ausgezeichnet, daß ihr Fehlen ein normales Gedeihen unmöglich macht. Da der Pflanzenertrag, also die Erzeugung an Pflanzensubstanz, in solchen Fällen nahezu Null ist, wurde für dieses Verhalten eines Nährstoffes noch eine andere Ausdrucksweise eingeführt. Man sagt, ein Nährstoff erfüllt die „Nullbedingung". Durch dieses Merkmal konnten die bis jetzt bekannten Nährstoffe praktisch ausreichend gekennzeichnet werden. Eine nicht unwesentliche Stütze erhielten die so gewonnenen Ergebnisse durch die Chemie insofern, als es ihr gelang, organische Verbindungen aus der Pflanzensubstanz zu isolieren, die offenbar für das Leben eine wichtige Rolle spielen, und zu deren Aufbau das Vorhandensein bestimmter Elemente in der Pflanze unbedingt nötig ist, wie z. B. Magnesium für das Chlorophyll, Schwefel für das Eiweiß usw. Bei mehreren Nährstoffen ist es bis heute aber leider unmöglich gewesen, ihre Aufgabe in der Pflanze festzustellen. So düngen wir beispielsweise unsere Äcker Jahr für Jahr mit Kali, weil die günstige Wirkung einer solchen Maßnahme erfahrungsmäßig bestätigt wurde. Über das tiefere „Warum" lassen sich nur Vermutungen anstellen.

Neben diesen unentbehrlichen Aschenelementen kommen in den Pflanzen noch verschiedene andere Elemente vor, und die Stimmen wollten nicht verstummen, die behaupteten, daß auch diese Elemente zum Teil für die Pflanze nötig sind. So behauptete *Raulin* bereits 1869, daß Eisen und Zink für *Aspergillus niger*, der auch in der vorliegenden Arbeit als Untersuchungsobjekt dient, nötig seien. *Ono* behauptete das Gleiche für Kupfer. Von anderen Forschern nachgeprüft, wurden diese Behauptungen in der Hauptsache bestritten, und das Zink beispielsweise in überwiegender Mehrheit als Reizstoff oder gar als Giftstoff bezeichnet. Erst in neuerer Zeit, nachdem es der Chemie inzwischen gelungen war, für viele Elemente empfindlichere Nachweise ausfindig zu machen, und nachdem sich das biologische Arbeiten hinsichtlich der Genauigkeit der Methoden mehr und mehr auf die äußerst geringen Nährsalzmengen umgestellt hatte, die ein Organismus unter Umständen für sein Gedeihen benötigt, konnte durch *Steinberg* (30), *Bortels* (6) und *Roberg* (25) (26) die Lebensnotwendigkeit von Zink, Eisen und Kupfer für *Aspergillus niger* einwandfrei festgestellt werden[1]. Als Kriterium

[1] Näher auf die geschichtliche Entwicklung der Zink- und Eisenfrage einzugehen, halte ich für überflüssig, nachdem *Roberg* und *Bortels* dies getan haben. In den Arbeiten der beiden Verfasser sind auch ausführliche Angaben über die Literatur vorhanden.

diente auch hier bei Eisen und Zink die Nullbedingung, bei Kupfer das Verschwinden der schwarzen Sporenfarbe und die Erniedrigung des Trockensubstanzgewichtes beim Fehlen des Elementes. Berücksichtigt man, daß in diesen Fällen Mengen von einigen Hundert Mikrogramm (1 μg = 0,001 mg) für 100 ccm Nährlösung zu einer optimalen Entwicklung genügten, also Mengen, die bereits nahe der Grenze der Nachweisbarkeit liegen, so kann man die experimentellen Schwierigkeiten bei der Feststellung der Wirkung eines solchen Stoffes beurteilen.

Wir müssen ferner die wichtige Schlußfolgerung daraus ziehen, daß die Vorgänge im pflanzlichen Organismus viel komplizierter sind, als ursprünglich angenommen wurde, und daß die bisher als unbedingt notwendig erkannten Elemente bei weitem noch nicht die Gesamtzahl aller nötigen Elemente bilden. Abgesehen davon, daß Elemente, deren Notwendigkeit bis jetzt noch nicht festgestellt wurde — für die Tatsache, daß noch weitere Elemente bzw. Stoffe nötig sind, liegen genügend Beweise vor —, in so geringen Mengen leicht als Verunreinigung in die Nährlösung gelangen konnen, darf nicht vergessen werden, daß Samen und Sporen in diesen Fällen sicherlich ebenfalls Spuren davon enthalten und so unbemerkt der sich entwickelnden Pflanze zuführen. Die Schwierigkeiten der Feststellung der Nullbedingung werden dadurch vermehrt und zwar in um so stärkerem Maße, je geringere Mengen die Pflanze davon benötigt. Die erschwerte Feststellung der Nullbedingung und der Umstand, daß eine Bestätigung der Notwendigkeit solcher nur in äußerst geringer Menge notwendigen Stoffe auf chemischem Wege vorerst noch äußerst schwierig ist, zwingen uns zu der Frage, ob es vorteilhaft ist, sich bei der Untersuchung des Nährstoffcharakters eines Stoffes als Kriterium der Nullbedingung allein zu bedienen. An die Zweckmäßigkeit der Vermehrung der Nährstoffmerkmale haben sicher schon mehrere Forscher gedacht. Die Schwierigkeit besteht nur in der Frage, woher weitere Merkmale genommen werden sollen, und zunächst in dem Nachweis, daß solche immer mit der Nullbedingung verbunden sind.

Die vorliegende Arbeit soll ein Beitrag sein zu den Versuchen, weitere Merkmale für den Nährstoffcharakter in die Pflanzenphysiologie einzuführen. Nachdem *A. Rippel* [(21) mit (24)] und *R. Meyer* [(15) mit (19)], auf den Versuchen von *Th. Pfeiffer* aufbauend, in den vergangenen Jahren Stickstoff, Phosphor und andere Faktoren wie Kalium, die Zeit und die Temperatur, in ihrer Wirkung auf den Ertrag untersucht hatten, war der Zweck der vorliegenden Arbeit zu prüfen, inwieweit die auf Grund dieser Arbeiten bei zweifelsfrei als Nährstoffe angesehenen Elementen festgestellten Merkmale sich eignen, auch zur Beurteilung des Nährstoffcharakters von Zink und anderen Stoffen zu dienen. Um das Ergebnis vorwegzunehmen, sei mitgeteilt, daß dies

bei Zink gelungen ist. Trotzdem wäre es voreilig, heute bereits mehr über die Brauchbarkeit dieser Methode aussagen zu wollen, bevor nicht weitere Elemente auf die gleiche Weise geprüft wurden, und bevor es nicht gelungen ist, die Unterschiede zwischen Nährstoff und Nichtnährstoff noch schärfer herauszuarbeiten. Mögen nun die Ergebnisse ausfallen, wie sie wollen: die Methode, die das Ertragsgesetz als Kriterium für den Nährstoffcharakter benutzt, verspricht jedenfalls zu einem tieferen Verständnis der mit unserer Frage verbundenen pflanzenphysiologischen Vorgänge zu führen.

Anschließend an die Zinkuntersuchungen wurden Phenol und Sublimat in ihrer Wirkung auf den Ertrag von *Aspergillus niger* geprüft, um auch den Begriff „Gift" nach dem gleichen Verfahren genauer festlegen zu können. Im Gegensatz zu dem Worte „Nährstoff" sind Definitionen für „Gift" in der einschlägigen Literatur vorhanden. So lesen wir bei *Benecke-Jost* (2) über „Gift": „Wie bemerkt, wirken viele Stoffe, auch unentbehrliche Nährstoffe, bei einer gewissen Konzentration schädlich, und wenn die Schädigungen nicht auf physikalische (osmotische), sondern auf chemische Wirkungen zurückzuführen sind, dann kann man diese Stoffe ‚Gifte' nennen." Eine im Grunde genommen ähnliche Definition sei noch von *E. Fröhner* (9) erwähnt, wenn sie auch nicht für Pflanzenphysiologen, sondern für Tierärzte geschrieben ist: „Gifte im engeren Sinne sind solche unbelebte chemische Stoffe, welche schon in geringer Menge und bei gewöhnlicher Art der Einverleibung regelmäßig erhebliche Störungen der Körperfunktionen hervorrufen." Zu einer solchen engeren Begrenzung des Giftbegriffes mag man leicht kommen, wenn man bedenkt, daß recht wechselnde Mengen der verschiedenen Stoffe eine Giftwirkung hervorrufen. So verhalten sich beispielsweise bei *Aspergillus niger* die schädigenden Wirkungen von Ammonsulfat zu denen von Zinksulfat bzw. Phenol wie etwa 500 : 13 : 1, d. h. es muß, roh ausgedrückt, für die gleich starke Schädigung, die wir mit einer bestimmten Menge Phenol erzielen, ungefähr die 13fache Menge Zinksulfat und ungefähr die 500fache Menge Ammonsulfat angewendet werden, wenn die übrigen Bestandteile der Nährlösung in ungefähr normalen Mengen vorhanden sind. Da gerade das Ertragsgesetz uns auf Schritt und Tritt lehrt, daß die Wirkung eines Stoffes mehr oder weniger von den übrigen Bedingungen abhängig ist, soll der aufgestellte Vergleich nur die großen Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Stoffe zeigen und den einzelnen Zahlenangaben hierbei keine allzu große Bedeutung beigelegt werden.

Definitionen für „Gift", wie die obigen, mögen unter Umständen vorteilhaft sein, um bei der Beschreibung einer bestimmten Materie nicht ins Uferlose zu geraten. Ob sie zu einer tieferen Erfassung der physiologischen Vorgänge bei der Giftwirkung einen Beitrag zu liefern

vermögen, bezweifle ich. Es dürfte in diesem Falle vielmehr in einer derartigen Definition die Gefahr liegen, daß der Weg zu dem gesteckten Ziele von vornherein verbaut wird. Denn es handelt sich hier um nichts anderes als die „kleine" Frage, ob wir überhaupt ein Recht haben, von einem Gegensatz zwischen „Nährstoff" und „Gift" zu sprechen, wenn — wie nach *Benecke-Jost* — auch unentbehrliche Nährstoffe giftig wirken können, und wenn umgekehrt Stoffe, die zeitweilig als Gifte angesehen wurden, als Nährstoffe erkannt werden. Jenes zeigt übrigens jede Ertragskurve eines Nährstoffes, wenn man nur den absteigenden Ast berücksichtigt. Wo liegt ferner, wenn man dem die Definition nach *Benecke-Jost* entgegenhält, äußerlich sichtbar die Grenze zwischen osmotischer und chemischer Wirkung? Aus diesem Grunde halte ich vorläufig den von *W. Heubner* (11) vertretenen Standpunkt für zweckmäßiger, unter Giftwirkung überhaupt jede durch Einwirkung von Stoffen verursachte Hemmung des normalen Stoffwechsels zu verstehen.

Die mit Phenol und Quecksilber durchgeführten Versuche sollten zeigen, ob zwischen den Nährstoffertragskurven und den Ertragskurven von Stoffen, die nach der üblichen Ansicht zweifelsfrei für Gifte gehalten werden, grundsätzliche Unterschiede bestehen. Dabei kam im Falle von Phenol und Sublimat in erster Linie das Schädigungsgebiet in Frage.

Komme ich zum Schluß dieser Betrachtungen nochmals auf die eingangs gestellte Frage zurück, ob der Begriff „Nährstoff" so selbstverständlich ist, daß man eine Auseinandersetzung mit ihm in den Lehrbüchern übergehen konnte, so möchte ich nunmehr feststellen, daß dies keineswegs der Fall ist, und daß die Wissenschaft, wie wir gesehen haben, vielmehr zu einer tieferen Erfassung der Begriffe „Nährstoff" und „Gift" noch nicht gekommen ist.

2. Vorversuche über Kohlebehandlung.

Die Ergebnisse der ersten Zinkversuche waren wenig zufriedenstellend, denn die Ertragsunterschiede zwischen den Kulturen mit und ohne Zink waren äußerst gering. Die Herstellung einer annähernd *biologisch zinkfreien* Nährlösung in größeren Mengen durch Behandlung mit Kohle — wie es auch *Bortels* und *Roberg* gemacht hatten — schien doch nicht so einfach zu sein, und ich entschloß mich daher, zunächst die Fehler meiner Behandlungsweise ausfindig zu machen.

Der Kohlebehandlung liegt der Gedanke zugrunde, die in der Nährlösung vorhandenen Spuren von Metallsalzen bei schwach alkalischer Reaktion in unlösliche Verbindungen wie Phosphate, Hydroxyde usw. überzuführen, damit sie von der Kohle adsorbiert werden können. Eine zu starke Verringerung oder Erhöhung der alkalischen Reaktion kann den gewünschten Erfolg mehr oder weniger gefährden. Es ist deshalb zweckmäßig, jeden in die Nährlösung gebrachten Bestandteil auf seine Reaktion sorgsamst zu prüfen. So hatten z. B. die schlechten Ergebnisse meiner

ersten Versuche ihre Ursache zum Teil darin, daß die von mir benutzte Kohle, die längere Zeit im Laboratorium gestanden hatte, damit behandeltes, doppelt destilliertes Wasser bzw. die Nährlösung ziemlich sauer machte. Ich verwendete deshalb nach diesen mißlungenen ersten Versuchen neue Carbo med. *Merck*, ferner Carbo animalis *Merck* und Carboraffin (*Lurgi*), um gleichzeitig die Leistungsfähigkeit der ersten gegenüber anderen Kohlearten zu prüfen. Bei den neuen Versuchen ging ich zunächst von dem Gedanken aus, daß die alkalische Reaktion der Lösung durch K_2HPO_4 in der Hitze zunimmt, und es schien möglich, daß die Ausfällung der Metallspuren dadurch beschleunigt würde. Ich versuchte daher die Behandlung mit den genannten drei Kohlearten einmal mit kochender Lösung, das andere Mal ließ ich die Lösung mit der Kohle unter öfterem Umschütteln etwa 24 Stunden stehen. In der heißen Lösung wäre Magnesium als Phosphat ausgefallen. Um dies zu vermeiden, behandelte ich das Magnesium, getrennt von den übrigen Bestandteilen der Nährlösung, mit Kohle in der Kälte bei schwach alkalischer Reaktion (Zusatz von K_2HPO_4). Kohle verwendete ich stets in 5%iger Aufschwemmung. Die Zusammensetzung der Nährlösung war die gleiche, wie sie bei den Versuchsbedingungen angegeben ist Die Ergebnisse waren bei der in der Kälte behandelten Lösung bedeutend· besser. Nach siebentägiger Wachstumszeit betrugen die Mycelgewichte:

	Carboraffin		Carbo medic.		Carbo anim.	
	Hitze	Kälte	Hitze	Kälte	Hitze	Kälte
Ohne Zink	322	216	343	114	237	137
Mit Zink	1050	869	954	853	1056	949

Die günstigste Wirkung hatte auch hier Carbo med. *Merck* aufzuweisen, und ich verwendete für die weiteren Versuche nur diese Kohle. Carboraffin wird nach einer mir später bekannt gewordenen Angabe (29) mit Zinkchlorid aktiviert, und es ist möglich, daß ihre schlechtere Wirkung zum Teil dadurch verursacht wurde. Aber auch jetzt waren die Ergebnisse noch weit von den von *Bortels* und *Roberg* erhaltenen entfernt. Die besseren Ergebnisse bei den Zink-Nullgaben der in der Kälte behandelten Lösung veranlaßten mich, zu prüfen, ob nicht auch die Einwirkungszeit einen Einfluß auf die Beseitigung der Metallspuren hat. Ich setzte zu diesem Zwecke eine bestimmte Menge Lösung an, gab die Kohle hinzu, schüttelte öfters und filtrierte nach Ablauf bestimmter Zeiten von der gut durchgeschüttelten Lösung einen bestimmten Teil ab. Die in Lösung verbleibende Kohle hat auf diese Weise im Verhältnis zur Flüssigkeit nicht allzusehr zugenommen. Die Ergebnisse des nach 7 Tagen beendigten Versuches sind:

Kohle-behandlungsdauer	Ohne Zink	Mit Zink
1/2 Tag	118	985
1 1/2 „	114	1017
2 1/2 „	71	1059

Bei einem anderen Versuch hatte ich die Kohle, deren Wirkung bei längerem Aufbewahren in den angebrochenen Paketen wesentlich abnahm, einem Vorschlag *Hofmanns* (12) folgend, zuvor auf 250 bis 300° erhitzt, um sie zu aktivieren.

In welchem Maße die Aktivität der Kohle bei der Adsorption eine Rolle spielt, ist aus einer Arbeit von *K. Skumburdis* (28) ersichtlich. Die dort vorhandenen Kurven zeigen, daß durch eine inaktive oder durch eine halb aktive Kohle eine quantitative Entfernung eines Stoffes aus einer Lösung entweder unmöglich oder erst mit riesigen Mengen Kohle möglich ist. Aber auch bei aktiven Kohlen ist die vollständige Entfernung eines Stoffes von der verwendeten Kohlemenge abhängig. Gestatten die Versuchsergebnisse betreffs der benötigten Kohlemenge zwar keine direkte Übertragung auf die vorliegenden Verhältnisse — es handelte sich in dieser Arbeit um die Entfernung organischer Stoffe aus Wasser —, so dürften sie immerhin nicht uninteressant sein. Je nach Kohleart benötigte *Skumburdis* 10 bis 16 g Kohle je 100 ccm Wasser. Ich glaube zwar nicht, daß bei meinen beiden Versuchen mit verschiedener Kohlebehandlungsdauer das Versuchsergebnis durch die vielleicht mit fortschreitender Behandlungszeit etwas größer gewordene Kohlemenge beeinflußt worden ist. Denn wenn gar keine Kohle aus der Lösung auf das Filter gekommen wäre, dann hätte die Kohlemenge bei dem folgenden Versuche, bei einer ursprünglichen Flüssigkeitsmenge von 1000 ccm und bei 50 g Kohle, am zweiten Tage nach Filtration von 150 ccm erst von 5 auf 5,9 g pro 100 ccm zugenommen, wodurch meines Erachtens kaum der Ertragsrückgang um über 50 % erklärt worden kann. Das Gleiche gilt für den folgenden halben Tag. Erst am dritten Tage hätte die Kohlemenge, immer unter der Voraussetzung, daß keine Kohle aus der Lösung auf das Filter gekommen wäre, 9,1 g pro 100 ccm Lösung, also nicht ganz das Doppelte, betragen. In Wirklichkeit aber wurde die Lösung, wie oben mitgeteilt, vor der Filtration gut durchgeschüttelt und absichtlich Kohle auf das Filter gebracht. Die Angaben von *Skumburdis* über die benötigten Kohlemengen halte ich bei womöglicher Wiederholung der Zinkversuche von anderer Seite unter Umständen für wertvoll, wenn in einem solchen Falle die Kohlebehandlung mit 5 % Kohle nicht den gewünschten Erfolg haben sollte. Nachdem *Bortels, Roberg* und ich ständig nur 5 % Kohle verwendet haben, könnte es den Anschein erwecken, als ob dies in jeder Beziehung optimale Mengen seien[1]. Weiter sei aus einer anderen Arbeit von *Skumburdis* (29) mitgeteilt, daß Carboraffin, Knochenkohle und in etwas stärkerem Maße Carbo med. *Merck* als saure Kohlen zu betrachten sind. Sie bewirken also einen Aziditätsanstieg der Lösung im Gegensatz zu den alkalischen Wasserdampfkohlen Supra Norit 5 ×, 4 × und Norit 3 ×. Supra Norit 5 × wurde von *O. Metz* (14) mit gutem Erfolge verwendet, und es ist nicht ausgeschlossen, daß diese Kohleart für die Beseitigung der Metallspuren aus der Nährlösung besser geeignet wäre als Carbo med. *Merck*.

Für die Aktivierung der Kohle benutzte ich eine Vorrichtung, wie sie zur Bestimmung des Antimons als Trisulfid (30) verwendet wird, lediglich mit der Änderung, daß das enge Ansatzstück des Glasrohres zugeschmolzen und der Kork mit einem Glashahn versehen war. Aus der Kohle ging beim Erhitzen reichlich Wasser weg. Zwecks Beseitigung der eventuell bereits in der Nährlösung vorhandenen Sporen von Mikroorganismen hatte ich die Nährlösung einmal im strömenden Dampf vor Zugabe der aktivierten Kohle sterilisiert. Für die +-Zinkgabe war diesmal nur ein Teil der am fünften Tage

---

[1] Im Zusammenhang damit sei auch auf die Arbeit von *Roberg* (26) hingewiesen, in welcher die gesamte Veränderung, die eine Nährlösung durch die Kohlebehandlung erfährt, genauer untersucht wurde.

filtrierten Lösung verwendet worden. Die Mycelien des auf diesen Kölbchen gewachsenen *Aspergillus* waren bei der Ernte (achter Tag) bereits in Autolyse übergegangen und hatten vorher sicher ein Gewicht von rund 2 g erreicht.

	Kohlebehandlung					
	1 Tag mg	2 Tage mg	2,5 Tage mg	3 Tage mg	4 Tage mg	5 Tage mg
Ohne Zink	195	81	19	12	10	226
Mit Zink	—	—	—	—	—	1450

Die erhaltenen Mycelgewichte zeigen, daß das Erhitzen der Kohle deren Leistung wesentlich gefördert hat. Die beiden Versuche zeigen ferner, daß auch die Einwirkungszeit einen Einfluß auf die Beseitigung der Metallspuren hat. Die Reaktion der Lösung wird dabei ebenfalls von der Kohle beeinflußt, indem die OH-Ionenkonzentration immer mehr abnimmt, und schließlich die Lösung schwach sauer reagiert (fünfter Tag), wie man mit Lackmuspapier nachweisen kann. Auf diese Weise konnten Metallspuren aus der Kohle wieder in Lösung gehen, und die Folge war ein Ansteigen des Mycelgewichts. Die Ergebnisse stehen zunächst im Gegensatz zu den von *Bortels* und *Roberg* erhaltenen, denen es gelang, bei nur kurzer Behandlungszeit mit Kohle den gewünschten Erfolg zu erzielen. Erklärungen für die Unterschiede zu geben, ist eine leichte Sache, schwieriger allerdings der Beweis, daß der oder jener Umstand auch wirklich die Ursache war. Da es aber nicht meine Aufgabe war, die Adsorptionsvorgänge an der Kohle zu untersuchen, habe ich mich mit dem erzielten Erfolge zufrieden gegeben, wenn es auch umständlich war, die Lösung erst einige Tage mit Kohle stehenzulassen, bis ich die Kulturen ansetzen konnte. Als einen Grund, der möglicherweise für die verschiedene Länge der nötigen Behandlungszeit in Betracht kommen könnte, möchte ich anführen, daß ich mit höheren Zuckerkonzentrationen arbeitete als die genannten Verfasser, und daß somit die Viskosität der Lösung auch eine höhere war. Ferner sind nach *Roberg* die Hauptverunreinigungen gerade in dem Zucker vorhanden. Auch sei an dieser Stelle bereits erwähnt, daß die Methode bei meinen letzten Versuchen versagte. Als ich die gleiche Kohle aus einem anderen Grunde mit durch K_2HPO_4 alkalisch gemachtem, doppelt destilliertem Wasser ebenfalls 3 Tage stehen ließ, waren beträchtliche Mengen Eisen trotz alkalischer Reaktion in Lösung gegangen, die in dem Filtrat bei längerem Stehen oder beim Kochen ausfielen. Wenn aber Eisen in solchen Mengen in Lösung gehen kann, ist es wahrscheinlich, daß auch Spuren von anderen Metallen dasselbe tun, so auch von Zink. Bei derartigen Beobachtungen darf man nicht vergessen, daß es unmöglich ist, ein Produkt von ständig gleichem Adsorptionswert herzustellen. Schwankungen in der Adsorptionskraft müssen in diesem Falle, wo es sich um Mengen handelt, die chemisch äußerst schwierig noch einwandfrei nachzuweisen sind, besonders stark zum Ausdruck kommen.

Zusammenfassend läßt sich über die Kohlebehandlung sagen, daß die Reaktion der Lösung, wie bereits von anderer Seite betont wurde, eine wichtige Rolle spielt, und die Adsorptionskraft der Kohle bei längerem Stehen zweifelsohne abnimmt. *Roberg* versuchte sich davor zu schützen, indem er die Kohle in Glasgefäßen aufbewahrte; ich habe die Aktivierung der Kohle vor dem Gebrauch vorgezogen. Im übrigen scheint es mir, gerade unter Bezugnahme auf meine letzten Versuche, unmöglich zu sein, ein ständig passendes Rezept für die Kohlebehandlung zu geben.

Schließlich sei noch erwähnt, daß *Roberg* auch den Versuch machte, die Nährlösung durch bloßes Aufkochen und Filtrieren von den Metallspuren zu befreien. Die von ihm so erhaltenen Mycelgewichte, die fast ebenso gering sind wie in den Zink-Nullgaben der mit Kohle behandelten Nährlösung, erwecken den Anschein, daß es ihm gelungen sei. Ich hatte die Methode ebenfalls probiert, weil es mir auf diese Weise möglich gewesen wäre, einmal in der gleichen Zeit eine größere Anzahl von Versuchen durchzuführen, ferner aber dadurch den Nachteil der Kohlebehandlung zu vermeiden, daß die Kohle stets außer den Schwermetallen auch andere Bestandteile der Nährlösung adsorbiert, und daß daher die Zusammensetzung der Lösung nach der Kohlebehandlung etwas verändert ist. Die von mir erhaltenen Ergebnisse lassen es aber fraglich erscheinen, ob die durch Kochen der Lösung in den Zn-Nullgaben erhaltenen geringen Mycelgewichte allein durch das Fehlen von Zink verursacht sind. Es machte mir vielmehr den Eindruck, als ob dieses geringe Wachstum auch durch das Fehlen von noch nicht näher bekannten anderen Stoffen verursacht würde, die *Aspergillus niger* zu seinem Wachstum ebenfalls benötigt, und die bei der Kohlebehandlung aus der Kohle in Lösung gehen. Ich hatte beispielsweise in einem derartigen Versuche einen Teil der Nährlösung wie gewöhnlich mit Kohle behandelt, den anderen Teil dagegen nur gekocht und filtriert. Die Mycelgewichte der mit Kohle behandelten Lösung waren drei- bis viermal, in den niederen Zn-Gaben sogar fünf- bis sechs- bis achtmal so hoch wie die der gekochten Nährlösung. Um welche Stoffe es sich hierbei handeln könnte, kann ich natürlich bei den wenigen Versuchen nicht sagen.

3. Die Versuchsbedingungen.

Die von mir verwendete Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

Wasser, doppelt destilliertes	1000 ccm
Rohrzucker	250 g
Sekundäres Kaliumphosphat	5 g
Kaliumsulfat.	2 g
Natriumnitrat	verschiedene Gaben
Magnesiumsulfat pro analysi *Merck*	1 g
Eisensulfat „ „ „ . . .	0,5 g
Kupfersulfat „ „ „	0,002 g
Zinksulfat „ „ „ . . .	steigende Gaben

Rohrzucker, sekundares Kaliumphosphat, Kaliumsulfat und Natriumnitrat wurden mit der entsprechenden Menge Wasser angesetzt, einige Tropfen Phenolphthalein zugegeben und einmal im strömenden Dampf sterilisiert. Reagierte die Lösung nach dem Erkalten zu schwach alkalisch, so gab ich eine Spur Natriumcarbonat hinzu und danach die inzwischen aktivierte Kohle. Das Magnesiumsulfat der verschiedenen Nitratgaben wurde zusammen in 100 ccm Wasser gelöst und der Flüssigkeit 0,5 g K_2HPO_4 und 5 g Kohle zugegeben. Die Lösungen blieben nun 72 Stunden unter häufigem Umschütteln stehen, danach wurde filtriert, Magnesium, Eisen und Kupfer zugegeben, die Lösung zu je 25 ccm in 100 ccm *Erlenmeyer*-Kölbchen abpipettiert und danach die verschiedenen Zinkmengen aus Zinklösungen verschiedener Konzentrationen hinzugefügt. Für die Zink-Nullgaben wurden immer die gleichen Kölbchen verwendet, die nach jeder Benutzung einige Tage mit Chromschwefelsäure stehen blieben. Danach wurden sie mit doppelt destilliertem Wasser ausgespült und 1 Tag mit

doppelt destilliertem Wasser stehengelassen, damit jeder Säurerest beseitigt war. Die mit Nährlösung versehenen Kölbchen sterilisierte ich einmal. Nach dem Erkalten wurden sie mit einer Sporenaufschwemmung von *Aspergillus niger* (alter *Göttinger Stamm*) — das doppelt dest. Wasser hierfür war ebenfalls mit K_2HPO_4 und Kohle behandelt worden — geimpft und, soweit nichts anderes angegeben, 5 Tage bei 25 $\pm$ 1° C in den Brutschrank gestellt. Danach wurden die Kulturen geerntet, wobei noch vorhandene Phosphatniederschläge in den Kulturen mit hohen Zinkgaben zuvor durch einige Tropfen Schwefelsäure gelöst worden waren. Die Mycelien wurden im Brutzimmer mehrere Tage vorgetrocknet, dann nochmals 24 Stunden in den Trockenschrank bei 100° C gestellt und anschließend gewogen. Ich arbeitete ständig mit fünf Parallelen.

Die Verwendung von Natriumnitrat statt Ammonsulfat als Stickstoffquelle geschah aus verschiedenen Gründen. Einmal fiel Magnesium in der schwach alkalischen Lösung bei Gegenwart von Ammoniak zum Teil als Magnesiumammoniumphosphat aus. Dadurch wurde nicht nur die Zusammensetzung sondern auch die Reaktion der Lösung verändert. Ferner liegt der absteigende Ast der Zinkertragskurve bei Ammonsulfat als Stickstoffquelle bei niedrigeren Zinkgaben als bei Natriumnitrat. Im ersteren Falle wird die schädigende Wirkung nicht allein durch Zink, sondern auch durch den Sulfatrest bedingt, worauf *Bortels* (6) bereits hinweist. Nachdem Magnesium aber auch bei Natriumnitrat als N-Quelle infolge der hohen Zuckerkonzentration ausfiel, habe ich, wie bereits erwähnt, das Magnesiumsulfat vom übrigen Teil der Nährlösung getrennt mit Kohle behandelt.

Wurde nach Entfernung der Kohle zu der Nährlösung Eisen, Kupfer und Zink zugegeben, so fielen sie als Phosphate aus. Die Mengen von Eisen und Kupfer waren zwar derart überoptimal gewählt, daß die nicht völlig gleichmäßige Verteilung in den einzelnen Kölbchen keinen wesentlichen Einfluß auf das Mycelgewicht hatte. Aber bei den höheren Zinkgaben, die, in Lösung vorhanden, die Entwicklung bereits hemmten, konnte in diesem Falle das Wachstum doch ungehindert einsetzen, weil das Zinkphosphat erst allmählich mit fortschreitendem Wachstum in Lösung ging; der Pilz war dann gegen Schädigungen nicht mehr so empfindlich. Umgekehrt mußte das Wachstum in diesem Falle zum Stillstand kommen, wenn alle Phosphorsäure durch Zink in Form von Zinkphosphat gebunden war, und die Wachstumshemmung war dann nicht durch Zink, sondern durch das Fehlen von Phosphorsäure bedingt. Idealer wäre also eine Nährlösung gewesen, in der die Metallsalze, durch Zugabe von Citronensäure oder Citraten beispielsweise, in Lösung gehalten worden wären. Derartige Zusätze wären aber erst nach der Kohlebehandlung möglich gewesen, weil sonst die Metallspuren in komplexer Form in Lösung geblieben und nicht von der Kohle adsorbiert worden wären, und die freie Säure hätte dazu noch die Reaktion gestört. Andererseits hätte ein derartiger Zusatz zur gereinigten Lösung infolge der nicht genügenden Reinheit eines solchen Präparates und der Unmöglichkeit, die Verunreinigungen völlig zu beseitigen, den Erfolg der Kohlebehandlung wieder aufgehoben. Ja, selbst in einer schlecht gereinigten Lösung konnte bei genügend alkalischer Reaktion der Pilz in den Nullgaben sein Wachstum nur langsam beginnen, weil die Metallspuren, von den dem Löslichkeitsprodukt entsprechenden geringen Mengen abgesehen, ungelöst vorhanden waren, während sie ihm bei Zugabe von Citronensäure von Anfang an zur Verfügung standen. Die Wachstums-

kurve war deshalb bei derartigen Versuchen im letzterwähnten Falle bedeutend steiler. Die Vorteile einer Verwendung von Citronensäure schienen mir die dabei eventuell auftretenden Nachteile nicht zu überwiegen, und aus diesem Grunde unterließ ich den Zusatz mit Ausnahme des zuletzt beschriebenen Versuches, wo er besonders erwähnt ist.

4. Die Nährstoffwirkung.

Als derzeitige Charakteristika einer Nährstoffertragskurve stellen *A. Rippel* und *R. Meyer* (22) fest: die Nullbedingung, das Vorhandensein eines Maximums, welches sich mit steigender Konzentration bzw. mit fortschreitender Entwicklungszeit nach höheren Nährstoffgaben verschiebt, die Konstanz der Anstiegstangente innerhalb gewisser Grenzen und den Wendepunkt im absteigenden Ast. Die Frage, ob beim Zink ähnliche Erscheinungen auftreten und welche, soll im folgenden behandelt werden. Als Funktionswert für die Ertragskurven wurde das arithmetische Mittel aus den Werten der fünf Parallelen verwendet.

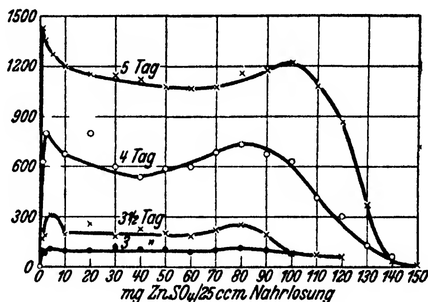


Abb. 1.
Zn-Ertragskurven bei verschieden langer Wachstumszeit.

Zunächst sei die zeitliche Veränderung der Ertragskurve, auch als Zn-Zeitertragsgesetz bezeichnet, besprochen.

An Natriumnitrat verwendete ich bei diesen Versuchen auf 100 ccm Wasser 2 g. Die Durchschnittswerte der Mycelgewichte der einzelnen Zn-Gaben und die mittleren Schwankungen zu Abb. 1 sind in Tabelle I angegeben. Trotz zweimaliger Wiederholung konnte eine einwandfreie Verschiebung eines oder beider Maxima, die, wie wir sehen werden, der Typ der Zn-Ertragskurve unter den von mir gewählten Versuchsbedingungen besitzt, mit fortschreitender Entwicklungszeit nach höheren Zn-Gaben, wie sie von *R. Meyer* bei Stickstoff und Phosphorsäure beobachtet wurde, nicht festgestellt werden. Doch halte ich auf Grund der Ergebnisse anderer Versuche eine geringe Verschiebung des zweiten Maximums, vielleicht zwischen 70 und 120 mg Zinksulfat, nicht für ausgeschlossen. Fest steht jedenfalls, daß die zeitliche Verschiebung des zweiten Maximums nach höheren Zn-Gaben, vorausgesetzt daß sie vorhanden, begrenzt ist, also nicht über eine bestimmte Zn-Höchstmenge hinausgehen kann. Das Bild der t-Ertragskurven verschiedener Zn-Gaben zeigt uns nämlich, daß das eigentliche Wachstum des Pilzes, je nach der N-Menge, in etwa 72 Stunden beendet ist; während dieser Zeit erhöht sich das Pilzgewicht von ungefähr 0 auf 2 g. Die Zeitkurven sind also sehr

Tabelle I.

Zn-Zeitertragsgesetz.

Zn	3 Tage	$3^1/_2$ Tage	4 Tage	5 Tage
0	2 ± 1	3 ± 0,9	3 ± 0,9	16 ± 9,6
0,2	29 ± 6,2	54 ± 14	111 ± 6,7	1123 ± 137
0,4	32 ± 6	78 ± 17,5	265 ± 78	1196 ± 145
1	88 ± 21,7	170 ± 57,2	625 ± 113	1432 ± 84,5
2	80 ± 7,2	187 ± 50	797 ± 76	1357 ± 38
4	115 ± 37	319 ± 67,5	574 ± 84,5	1279 ± 69,5
10	98 ± 11	196 ± 40	675 ± 83	1197 ± 46,5
20	96 ± 25,8	264 ± 95	797 ± 150	1155 ± 59
30	111 ± 28,2	179 ± 23,6	606 ± 32,5	1136 ± 92,5
40	108 ± 27,5	228 ± 46	538 ± 56	1122 ± 25,8
50	108 ± 11,7	194 ± 40	582 ± 78,5	1081 ± 39,4
60	90 ± 12,6	189 ± 62	598 ± 68	1065 ± 82
70	98 ± 10,3	223 ± 34	683 ± 104	1078 ± 75,4
80	111 ± 33	256 ± 88	733 ± 67,5	1162 ± 61
90	97 ± 12,4	197 ± 22,1	675 ± 100	1178 ± 98,6
100	85 ± 20,2	94 ± 12,5	635 ± 69	1220 ± 75
110	—	76 ± 16,6	400 ± 91,2	1076 ± 110
120	—	56 ± 14,8	301 ± 74	874 ± 113
130	—	—	133 ± 63	366 ± 50
140	—	—	57 ± 15	37 ± 26
150	—	—	—	13 ± 7

Zn = mg $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$/25 ccm Nährlösung, N = g $NaNO_3$/100 ccm H_2O, Mycelgewicht in mg.

steil. Bei Zn-Gaben über 100 mg verläuft die Kurve zunächst fast wagerecht und erst nach einer bestimmten Zahl von Tagen setzt der steile Anstieg ein. Je länger dieser zunächst wagerechte Verlauf der Kurve dauert, eine um so größere Menge Zucker wurde vom Pilz inzwischen bereits veratmet, und wahrscheinlich aus diesem Grunde sind die Höchstmycelgewichte hier niedriger als bei geringeren Zn-Gaben. Es sind die Verhältnisse bei Zink, was die *t*-Ertragskurven verschiedener Zn-Gaben betrifft, also ähnlich denen von Stickstoff oder anderen Neutralsalzen, wie sie von *R. Meyer* (15) und *W. Estor* (8) festgestellt wurden.

Das Zn-N-Ertragsgesetz zeigt uns die Abb. 2a und 2b. Die den Kurven entsprechenden Werte sind in Tabelle II angegeben. Auffallend ist auch hier die Kurvenform, wenngleich solche Sattelkurven bereits öfters beobachtet worden sind. So fand z. B. *Arrhenius*, nach *K. Boresch* [(4), S. 166], zwei Produktionsmaxima für die Abhängigkeit des Ertrages einzelner Kulturpflanzen von der Bodenreaktion. Da ich während der ersten Versuche die Kolben derart im Brutschrank stehen hatte, daß in jedes Fach eine Ertragsreihe kam, und zwar die niedrigen Zn-Gaben jeder Reihe an die Rückwand, die höchsten Zn-Gaben an die Tür (= *Aufstellung I*), wäre es auch möglich gewesen, daß das

Tabelle II. Zn-N-Ertragsgesetz. a) Zinkertragskurven.

Zn	N 0,05	N 0,5	N 2	N 8	N 12	N 16
0	79 ± 9	27 ± 12	8 ± 4,5	19 ± 7,9	0	0
0,2	94 ± 4,5	707 ± 43	1439 ± 105	454 ± 32	160 ± 45	22 ± 4,8
0,4	100 ± 3,7	724 ± 19,9	1511 ± 44	947 ± 296	369 ± 86,2	41 ± 11,7
1	107 ± 12,6	654 ± 27,3	1742 ± 62	1601 ± 158	754 ± 144	32 ± 10,9
2	106 ± 4,5	600 ± 11,6	1695 ± 48,5	1596 ± 244	700 ± 172	41 ± 15,3
4	111 ± 13,9	665 ± 96	1625 ± 91	1739 ± 131	811 ± 159	91 ± 24,9
10	98 ± 2,8	625 ± 91	1505 ± 84	1626 ± 72,5	663 ± 162	117 ± 24,6
20	100 ± 2,8	638 ± 28,9	1544 ± 102	1693 ± 58	791 ± 88	250 ± 43
30	103 ± 6,9	586 ± 17,1	1533 ± 73	1419 ± 159	772 ± 126	403 ± 54
40	92 ± 9	603 ± 38,6	1631 ± 83	1386 ± 54,5	826 ± 103	534 ± 150
50	97 ± 3,3	617 ± 17	1686 ± 52,7	1241 ± 113	670 ± 128	611 ± 71
60	103 ± 6,3	591 ± 38	1404 ± 34,8	1259 ± 64	711 ± 60	631 ± 162
65	—	—	—	1231 ± 116	—	—
70	107 ± 8,6	673 ± 32	1307 ± 157	1345 ± 80	856 ± 88,5	723 ± 134
75	—	—	—	1370 ± 73,5	—	—
80	113 ± 14,5	655 ± 40,2	782 ± 203,2	1395 ± 37,4	992 ± 52	788 ± 73
85	—	—	—	1346 ± 103,5	—	—
90	61 ± 9,1	529 ± 40,4	185 ± 51	1356 ± 48,5	887 ± 107	799 ± 132
95	—	—	—	1218 ± 119	—	—
100	7 ± 2,6	278 ± 128	21 ± 7	1204 ± 88	914 ± 78	601 ± 92
110	—	—	—	696 ± 217	641 ± 97	542 ± 90
120	—	—	—	431 ± 58	347 ± 102	—

b) Stickstoffertragskurven.

Zn	N 0,5	N 1	N 2	N 4	N 6	N 8	N 12	N 16
0	933 ± 7,4	1394 ± 83,2	1261 ± 73,9	664 ± 44	625 ± 97	245 ± 111	6	0
0,2	893 ± 45	1426 ± 74	1616 ± 120	1326 ± 214	1579 ± 130	1097 ± 162	78 ± 8,5	0
2	893 ± 51,4	1637 ± 148	1813 ± 67,6	1669 ± 46	1745 ± 56	1581 ± 91,2	124 ± 66,3	0
50	839 ± 26,2	1671 ± 57,5	1790 ± 66	1626 ± 26,8	1600 ± 49	1407 ± 83,2	1135 ± 111	538 ± 178
100	757 ± 44,2	1357 ± 122	1644 ± 88	1499 ± 39,4	1571 ± 28	1495 ± 47	1160 ± 214	846 ± 236
130	593 ± 28,7	1017 ± 112	1292 ± 45,7	1145 ± 44,3	1079 ± 94	596 ± 72,3	189 ± 72,4	98 ± 35,6
150	528 ± 30,9	908 ± 70,4	686 ± 161	338 ± 63	131 ± 45	56 ± 21,4	0	0

erste, äußerst spitze Maximum durch die Anordnung der Kölbchen im Brutschrank bedingt gewesen sei. Bei späteren Versuchen stellte ich daher zwar auch je eine Ertragsreihe in je ein Fach, aber jetzt zunächst von den verschiedenen Zn-Gaben jeder Reihe die ersten Kolben an die Rückwand, dann von allen Gaben die zweiten Kolben usw., um auf diese Weise eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Kolben in einem Fach zu erzielen (= *Aufstellnng II*). Auch hier traten die beiden Maxima wieder auf. Es muß also angenommen werden, daß diese Sattelkurven nicht durch eine ungleichmäßige Anordnung der Kolben im Brutschrank bedingt sind. Wohl habe ich daneben auch Kurven mit nur einem Maximum erhalten. Addiere ich die Ertragskurven mit

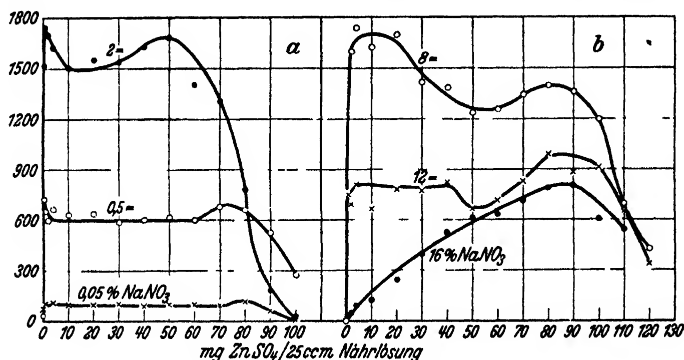


Abb. 2a und 2b*
Zn-Ertragskurven bei verschiedenen Nitratgaben.

einem und mit zwei Maxima, so verhalten sich jene zu diesen wie 1 : 3 — 4. Um Mißverständnisse zu vermeiden, sei erwähnt, daß die beiden diesbezüglichen Kurvenbilder (Abb. 2a und 2b) die Ergebnisse zweier zu verschiedener Zeit angestellter Versuche sind, wobei die Kolben bei Abb. 2a in der zuerst erwähnten, bei Abb. 2b in der zweiten und vielleicht gleichmäßigeren Reihenfolge aufgestellt waren. Nur durch diese verschiedene Aufstellung ist es verursacht, daß der absteigende Ast bei Abb. 2b erst bei höheren Zn-Gaben liegt.

Die Lage des ersten und zunächst höheren Maximums der Zn-Ertragskurven befindet sich bis einschließlich 8 % Natriumnitrat zwischen 0,2 und 2 mg Zinksulfat. Oberhalb 8 % tritt ein Wechsel ein; das höhere Maximum liegt jetzt bei etwa 80 mg, bei 16 und 20 % Natriumnitrat ist nur noch ein Maximum vorhanden, ebenfalls um 80 mg Zinksulfat herum. Können diese bei den höheren Zinkgaben

---

* Abb. 2a zeigt auf Grund der Kurve von 0,05 % Nitrat, daß die Anstiegstangente der N-Ertragskurven weitgehend unabhängig von der Zn-Gabe sein muß.

liegenden Maxima der Kurven von 12 und 16% Natriumnitrat als normal angesehen werden, oder sind es Zufallserscheinungen? Zur Beantwortung dieser Frage wurden in Abb. 3a aus den Abb. 2b zugrunde liegenden Zahlen drei Punkte der N-Ertragskurven bei verschiedenen Zn-Gaben konstruiert. Man sieht, daß die Kurven von 80 und 100 mg Zinksulfat die von 2 mg überschneiden. Die gleiche Erscheinung beobachtet man auf dem Kurvenbild steigender Stickstoffmengen bei verschiedenen Zn-Gaben (Abb. 3b), und dieses Ergebnis ist durch eine weitere Wiederholung nochmals bestätigt worden. Die Lage des höheren Maximums von 8% Natriumnitrat an bei höheren Zn-Gaben muß demnach als wirklich angenommen werden.

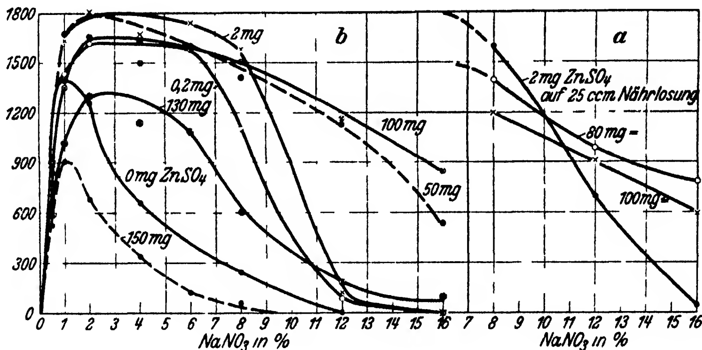


Abb. 3a und 3b
N-Ertragskurven bei verschiedenen Zn-Mengen

Abb. 3b zeigt uns ferner, daß eine Maximumverschiebung bei Stickstoff auch in Abhängigkeit von der Zn-Gabe zwischen 0 und 2% Natriumnitrat vorhanden ist, obgleich diesmal die Werte der Zn-Nullgabe sehr schlecht ausgefallen sind. Dies ist der bereits bei der Kohlebehandlung (auf S. 38) erwähnte Fall. Doch geht die Abnahme der Erträge der Zn-Nullgaben bei steigenden N-Mengen auch aus anderen Versuchen hervor.

	0,05% $NaNO_3$ mg	0,5% $NaNO_3$ mg	2% $NaNO_3$ mg
Mycelgewichte der Zn-Nullgaben anderer Versuche	79	27	8
	42	22	6
	—	133	51

Wer die Zn-Ertragskurve lediglich bei einer Stickstoffgabe untersuchen will, verwendet vorteilhaft eine höhere N-Gabe wie 2 bis 4% $NaNO_3$, weil die Nullbedingung hier viel leichter erreicht wird. Es handelt sich in diesem Falle wohl um die auch bei höheren Pflanzen

beobachtete Erscheinung, daß dann, wenn bei einem Nährstoffgemisch der eine Faktor fast Null wird, ein anderer Faktor schon bei Konzentrationen schädlich wirkt, die bei Besserstellung des ersten Faktors keinerlei Schädigung hervorrufen würden. Bei hohen Zn-Gaben beobachtet man eine Rückläufigkeit des Maximums innerhalb des Bereiches von 2 % $NaNO_3$ und Null. Da 0,2 mg Zinksulfat, vielleicht auch bereits 0,1 mg und noch weniger, je 25 ccm Nährlösung für die ganze Maximumverschiebung genügen, wird es verständlich, warum bei der Untersuchung des Zn-*t*-Ertragsgesetzes (Abb. 1) keine Maximumverschiebung bei den niedrigen Zn-Gaben festgestellt werden konnte.

Abschließend sei noch angeführt, daß die Nullbedingung für Zink auch in den Untersuchungen von *Bortels*, *Roberg* und *Steinberg* festgestellt worden ist. Die Anstiegstangente wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, weil diese Versuche nicht nur ein äußerstes Maß von Exaktheit, sondern auch einen erheblichen Zeitaufwand erfordern. Die erhaltenen Versuchsergebnisse machen es aber wahrscheinlich, daß sie zum mindesten über 12 % Natriumnitrat hinaus inkonstant wird und einen anderen, niedrigeren Wert hat wie unterhalb 12 %. Die von *A. Rippel* und *R. Meyer* (24) beobachtete zeitliche Veränderlichkeit der Anstiegstangente ist nach Abb. 1 auch bei Zn vorhanden.

Die Ergebnisse zeigen somit, daß bei Zink als Grundfaktor in Übereinstimmung mit Stickstoff und Phosphorsäure eine Maximumverschiebung der N-Ertragskurven mit steigenden Zn-Mengen und eine Rückläufigkeit bei sehr hohen Zn-Gaben besteht, und daß ferner die Nullbedingung erfüllt ist. Es unterscheidet sich das Zink bis jetzt von dem bisher am besten untersuchten Nährstoff N durch das Fehlen einer zeitlichen Maximumverschiebung. Es muß jedoch abgewartet werden, ob nicht auch bei anderen unzweifelhaften Nährstoffen eine solche zeitliche Maximumverschiebung fehlen oder doch sehr wenig in Erscheinung treten kann, bevor man diese Erscheinung gegen den Nährstoffcharakter des Zinks heranziehen darf, zumal infolge des außerordentlich steilen Anstiegs diese Verschiebung beim Zink für das erste Maximum verdeckt sein könnte.

5. Die Giftwirkung.

Die Giftwirkung kommt sichtbar im absteigenden Ast zum Ausdruck. Doch müssen wir nach *A. Rippel* und *R. Meyer* (22) hemmende Faktoren als von Anfang an wirksam annehmen, eine Anschauung, der sich auch andere Forscher angeschlossen haben. Im Gegensatz zur Nährstoffwirkung, für die wir, wie im vorhergehenden Kapitel gezeigt wurde, verschiedene Kriterien besitzen, steht uns für die Charakterisierung der Giftwirkung in unserem Falle nur der Ertragsrückgang als

Kriterium zur Verfügung. In Verbindung damit kann unter Umständen auch die Berücksichtigung der Neigung des absteigenden Astes von Vorteil sein.

Genau genommen haben wir bei der Zn-Ertragskurve als Typ einer zweigipfeligen Kurve zwei absteigende Äste, von denen jeder einen Wendepunkt besitzt. Davon ist der nach dem ersten Maximum liegende analytisch selbstverständlich. Hier soll nur der am Ende der Zn-Ertragskurve befindliche absteigende Ast berücksichtigt werden.

Bevor ich zur Besprechung der Phenol- und Quecksilberertragskurven ubergehe, seien zunächst die von Zink abweichenden Versuchsbedingungen erwähnt Die Kohlebehandlung wurde weggelassen, da das Hauptgewicht der Untersuchung auf die Prufung des absteigenden Astes gelegt wurde. Anstatt des doppelt destillierten Wassers wurde

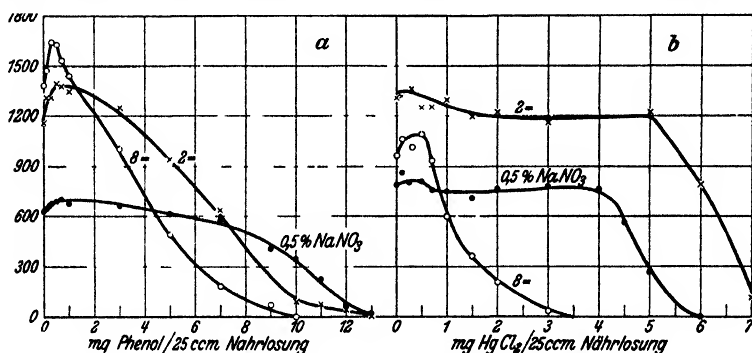


Abb 4a und 4b
Phenol- (a) und Quecksilber- (b) Ertragskurven bei verschiedenen N-Gaben

das im Institut vorhandene Regenwasser verwendet, und der Zuckergehalt der Losung wurde von 250 g/1000 ccm auf 220 g/1000 ccm vermindert, um die Zuckeradsorption durch die Kohle bei den Zn-Versuchen etwas zu berücksichtigen. An $ZnSO_4$ 7 H_2O wurden 80 mg/1000 ccm Wasser gegeben, und die Versuchsdauer im Interesse geringerer Schwankungen auf 6 Tage erhoht. Abb 4a zeigt die Phenol-, Abb. 4b die Quecksilberertragskurven. Die dazugehorigen Werte sind in Tabelle III und IV angegeben.

Tabelle III. Phenol-N-Ertragsgesetz.

Phenol	N 0,5	N 2	N 8
0	627 ± 27	1157 ± 67,7	1378 ± 117
0,1	641 ± 25,8	1302 ± 196	1475 ± 143
0,3	673 ± 64,5	1312 ± 39	1640 ± 101
0,5	691 ± 42,3	1396 ± 68	1578 ± 178
0,7	704 ± 62,5	1377 ± 46,6	1521 ± 134

Tabelle III (Fortsetzung).

Phenol	N 0,5	N 2	N 8
1	672 ± 30	1345 ± 53	1445 ± 216
3	660 ± 20,8	1248 ± 83	1004 ± 129
5	611 ± 83,2	950 ± 194	486 ± 172
7	580 ± 36,4	637 ± 117	176 ± 34
9	414 ± 69	453 ± 228	66 ± 23,9
10	343 ± 50,3	87 ± 13	0
11	226 ± 116	73 ± 10,7	0
12	75 ± 10,7	40 ± 7,8	0
13	22 ± 4,2	0	0

Tabelle IV. Hg-N-Ertragsgesetz.

Hg	N 0,5	N 2	N 8
0	786 ± 17	1316 ± 107	957 ± 136
0,1	861 ± 128	1321 ± 98,2	1060 ± 211
0,3	799 ± 16,8	1366 ± 77	1010 ± 130,5
0,5	808 ± 67,5	1249 ± 91	1095 ± 305
0,7	754 ± 16	1251 ± 232	933 ± 117
1	749 ± 33	1296 ± 120	592 ± 345
1,5	717 ± 38,2	1196 ± 7,5	362 ± 185
2	766 ± 54,2	1216 ± 67,2	203 ± 124,5
3	780 ± 61,5	1160 ± 164	36 ± 21,6
4	767 ± 72	—	0
4,5	566 ± 138	1077 ± 168	0
5	272 ± 153	1216 ± 78,2	0
6	4 (1)*	786 ± 230	0
7	0	112 (2)*	0

* Die in Klammern befindlichen Zahlen geben an, in wieviel Kolben noch Wachstum eingetreten war.

Von einem erschöpfenden Studium des Einflusses von Phenol und Quecksilber auf das Wachstum von *Aspergillus niger* kann naturlich bei den wenigen Versuchen nicht die Rede sein. Bei beiden Stoffen konnte ein Wendepunkt im absteigenden Ast festgestellt werden, doch kommt er beim Quecksilber infolge des steilen Kurvenabfalles bei ungenugender Staffelung der Hg-Gaben manchmal nicht deutlich zum Ausdruck. Auch bei der Kurve mit 2% Nitrat in Abb. 4b ist dies der Fall. Da bereits bei 7 mg $HgCl_2$ nur in zwei Parallelen Wachstum eingetreten war, ist anzunehmen, daß ein nennenswertes Wachstum über 7 mg nicht mehr möglich gewesen wäre. Der Wendepunkt, wenn er in diesem Falle noch vorhanden ist, müßte vielmehr in dem Kurvenstück zwischen 6 und 7 mg Quecksilberchlorid liegen. Für eine genaue Beantwortung der Frage nach dem Wendepunkt wären in diesem Falle die Funktionswerte für 5,5 und 6,5 mg notwendig, die leider fehlen.

Weiter hat das Phenol mit dem Zink gemeinsam, daß sich die Kurven von 0,5 und 2% Nitrat überschneiden. Diese Überschneidung sagt uns,

daß die Steigerung eines zweiten Wachstumsfaktors (hier Stickstoff) die Widerstandsfähigkeit des Versuchsobjektes gegenüber gleich hohen Gaben des zu variierenden Faktors herabgesetzt hat. Betreff des Zinks muß aber noch erwähnt werden, daß diese Überschneidung in den gleichen Nitratgaben nur bei zwei Versuchen (Aufstellung I, siehe S. 42) auftrat, während beim dritten Male (Aufstellung II) die Mycelgewichte der beiden Ertragsreihen im letzten Teil des absteigenden Astes ungefähr gleich groß waren, und die beiden Kurven sich mehr oder weniger überdeckten. Auch bei Quecksilber trat diese Überschneidung nur in der Wiederholung des Abb. 4b entsprechenden Versuchs ein, während sie in der Abb. 4b selbst nicht vorhanden ist. Das heißt natürlich nicht, daß dann überhaupt keine Überschneidung stattfindet; sonst müßten ja mit steigenden Nitratmengen immer größere Gaben von Quecksilber vertragen werden. Das ist keineswegs der Fall, wie die Ertragsreihe mit 8 % Nitrat zeigt. Es ist nicht ausgeschlossen, daß hier eine Überschneidung der Ertragskurven vielleicht zwischen 2 und 4 % Nitrat vorhanden gewesen wäre. Dieses Merkmal ist anscheinend nicht ganz konstant, was vielleicht zum Teil durch die großen Schwankungen im absteigenden Ast verursacht wird

In gleicher Richtung liegt, daß Phenol und Sublimat sich vom Zinksulfat durch das frühzeitige und deutliche Eintreten der Giftwirkung bereits bei niederen Nitratgaben unterscheiden (8 %). Im Gegensatz dazu verträgt *Aspergillus* bei 2 % Nitrat ebensoviel Zink wie bei den hoheren Nitratgaben von 16 %. Nach Abb. 2b wirken bei diesen hohen Nitratgaben großere Zinkmengen geradezu fördernd auf das Wachstum Ein weiterer Unterschied zwischen den genannten Stoffen ist der, daß die bei Phenol und Quecksilber das Wachstum während der 6tägigen Versuchszeit unterdrückenden Mengen im Gegensatz zu Zink auch bei noch so langer Versuchszeit nicht überwunden werden konnen, also anscheinend todlich wirken Zur Nachprüfung dieser bei Quecksilber und Phenol gemachten Beobachtungen war noch ein besonderer Versuch durchgefuhrt worden.

Bei diesem wurde abweichend von den früheren Untersuchungen Citronensäure (1,5 %) zugegeben, damit die Metallsalze in Lösung blieben. Die Nitratmenge war 2 g/100 ccm Wasser. Der Versuch wurde mit drei verschiedenen Zuckermengen (5, 12 und 25 %) durchgeführt, da ja nicht bekannt war, ob nicht durch die gewöhnlich verwendete Zuckermenge von 25 % bereits stärkere Wachstumshemmungen bei sehr hohen Metallsalzgaben verursacht würden. Wie Tabelle V zeigt, war die Entwicklung bei 12 % Zucker etwas besser. Von einer Wachstumshemmung durch 25 % Zucker kann aber nicht gesprochen werden. Angesetzt hatte ich den Versuch am 27. März. Die hinter den Mycelgewichten befindlichen Daten geben den Tag der Ernte an. Die mit *

versehenen Gewichte wurden nachträglich, als die betreffenden Mycelien längst in Autolyse ubergegangen waren, noch festgestellt, um zu zeigen, daß in diesen Gaben noch gutes Wachstum vorhanden war. Nach welcher Zeit in den einzelnen Gaben das Wachstum einsetzte, ist aus Tabelle VI ersichtlich. Man sieht, daß im Gegensatz zu Quecksilber

Tabelle V.

Zn	5 % Zucker	12 % Zucker	25 % Zucker
25	650 (1 IV.)	1068 (1. IV)	713 (1. IV.)
300	400 (12. VI)	437 (12 VI.)	352 (12. VI.)
Hg	**5 % Zucker**	**12 % Zucker**	**25 % Zucker**
1	581 (1. IV.)	1061 (1. IV)	524 (1. IV.)
4	0	350*	373*
6	0	0	0
Phenol	**5 % Zucker**	**12 % Zucker**	**25 % Zucker**
2	599 (31 III.)	1124 (31. III)	835 (1. IV)
8	586 (1 IV)	1102 (1 IV)	682 (1 IV.)
12	605 (2 IV)	802 (2 IV)	968 (2 IV)
16	381*	413*	402*
20	0	0	0

* Diese Gewichte stammen von bereits in Autolyse ubergegangenen Mycelien

Tabelle VI.

Wachstums-beginn bei	25 mg $ZnSO_4$ pro 25 ccm	100 mg $ZnSO_4$	150 mg $ZnSO_4$	200 mg $ZnSO_4$	250 mg $ZnSO_4$	300 mg $ZnSO_4$	350 mg $ZnSO_4$
5% Zucker	2 Tage	3 Tage	6 Tage	10 Tage	16 Tage	ungefahr nach 30 Tagen	65 Tage
12% „	2 „	3 „	6 „	10 „	16 „		65 „
25% „	2 „	3 „	6 „	10 „	16 „		—

Wachstums-beginn bei	Phenol 2 mg pro 25 ccm	8 mg	12 mg	16 mg	20 mg	24 mg
5% Zucker	1 Tag	2 Tage	3 Tage	6 Tage	—	—
12% „	1 Tag	2 „	3 „	6 „	—	—
25% „	2 Tage	2 „	3 „	6 „	—	—

Wachstums-beginn bei	1 mg $HgCl_2$ pro 25 ccm	4 mg $HgCl_2$	6 mg $HgCl_2$	8 mg $HgCl_2$
5 % Zucker	2 Tage	—	—	—
12 % „	2 „	6 Tage	—	—
25 % „	2 „	3 „	—	—

und Phenol die Entwicklung des *Aspergillus* bei Zink mit fortschreitender Wachstumszeit in immer höheren Gaben einsetzte. Der Pilz konnte bei Sublimat in Gaben von über 4 mg und bei Phenol in solchen von über 16 mg während einer dreimonatlichen Versuchszeit nicht mehr zur Entwicklung kommen (Tabelle VI). Im Gegensatz dazu war bei Zink das Wachstum in dieser Zeit bis zu 300 mg fortgeschritten und hatte bei Beendigung des Versuches eben bei 350 mg Zinksulfat eingesetzt. Berücksichtigt muß dabei werden, daß die Konzentration der Lösung inzwischen durch Wasserverdunstung ebenfalls zugenommen hatte. Sollte dieses Verhalten auch bei anderen sogenannten Giftstoffen auftreten, dann könnte ihm vielleicht die Rolle eines Unterscheidungsmerkmales zukommen. Es wäre weiter möglich, daß bei der Untersuchung der zeitlichen Veränderung einer derartigen Ertragskurve der Wendepunkt nach einer gewissen Wachstumszeit verschwindet, wenn eine bestimmte höhere Gabe des zu untersuchenden Stoffes nicht mehr überwunden werden kann. Zu dieser Vermutung werde ich durch die bereits mitgeteilte Beobachtung veranlaßt, daß bei gutentwickelten Hg-Ertragskurven und bei 2% Nitrat, wo also die beste Entwicklung vorhanden war, das Vorhandensein eines Wendepunktes aus meinen Versuchsergebnissen nicht hervorgeht. Die Punkte des absteigenden Astes liegen in diesen Fällen mehr oder weniger auf einer Geraden.

Zur Beantwortung dieser Frage sind jedoch weitere Versuche mit dichterer Staffelung der Quecksilbergaben in dem fraglichen Gebiet nötig.

Auffallend ist ferner bei den Sublimatversuchen, daß im allgemeinen die höchste, mitunter auch die zweithöchste Gabe einer Ertragsreihe zum Unterschied von Phenol und Zink nicht mehr in allen Parallelen Wachstum aufweist. In solchen Fällen ist in der Tabelle IV an Stelle der Schwankungen die Zahl der Kölbchen, in welchen noch eine Entwicklung eintrat, angegeben. Bei der Herstellung der Sporenaufschwemmung läßt es sich nicht ganz vermeiden, daß außer den Sporen noch Mycelfäden in die Aufschwemmung gelangen. Vielleicht sind diese widerstandsfähiger gegen das Quecksilber als die keimenden Sporen und bedingen so das unregelmäßige Wachstum am Ende der Ertragskurve.

Hinsichtlich des übrigen Teiles der Kurven von Quecksilber und Phenol sei erwähnt, daß für das letztgenannte bei den Versuchsbedingungen in Abb. 4a die Nullbedingung jedenfalls nicht gilt. Den Einwand, das Regenwasser hätte womöglich Phenolspuren enthalten können, lasse ich unberücksichtigt. Doch habe ich die Verwertung von Phenol als einziger Kohlenstoffquelle durch *Aspergillus* geprüft, wobei ein geringes Wachstum bei 3 und 5 mg Phenol eingetreten war, während die Kölbchen ohne Phenol keinerlei Wachstum zeigten. Bei 5 mg Phenol waren es schätzungsweise 1 bis 2 mg Mycel und mehr als bei

3 mg. Leider hatte ich keine größeren Phenolgaben, wie 10 und 15 mg Phenol, angesetzt. Die Nährlösung hatte die gleiche Zusammensetzung wie in den übrigen Versuchen. Nur war in diesem Falle eben die einzige Kohlenstoffquelle Phenol. Als Wasser wurde natürlich doppelt destilliertes verwendet. Das erhaltene Ergebnis stimmt mit den Angaben von *Th. Bokorny* (3) überein, der in einer Nährlösung mit 0,05 % Phenol als einziger Kohlenstoffquelle eine schwache Vegetation von nicht näher festgestellten Wasser- bzw. Luftpilzen beobachtet hatte. Diese Phenolmenge von 0,05 % ist etwas niedriger als die von mir festgestellte tödliche Gabe, die zwischen 0,064 und 0,08 % liegt. Daß *Hiroshi Tamiya* (31) in einer 2,4 %igen Phenollösung bei *Aspergillus oryzae* kein Wachstum feststellen konnte, ist auf Grund des Gesagten wohl verständlich. Berücksichtigt man, daß bei einer etwa 25 %igen Zuckerlösung oder bei 6 g Zucker/25 ccm Mycelgewichte von rund 2 g erhalten wurden, so könnte man bei 6 mg Zucker schätzungsweise auch nur 2 bis 3 mg Mycel erhalten. Damit möchte ich sagen, daß uns die wenn auch geringen Mycelgewichte nicht verleiten dürfen, dem Phenol von Anfang an jede Nährstoffwirkung abzusprechen. In Abb. 4a kommt diese Nährstoffwirkung des Phenols nicht zum Ausdruck, denn dem Pilz steht in Form von Zucker eine viel bessere Kohlenstoffquelle zur Verfügung. Ferner sind in allen drei Reihen die Mycelgewichte bei 5 mg Phenol bereits geringer als bei 3 mg, und die ertragssteigernde Wirkung desselben liegt in Abb. 4a bei viel geringeren Gaben. Über die Ursache dieser Ertragssteigerung lassen sich naturlich nur Vermutungen anstellen.

Auch bei Quecksilber konnte, wenn auch nicht immer, eine geringe Ertragssteigerung festgestellt werden. Die Frage der Nullbedingung ist hier nicht so einfach zu beantworten. Immerhin erscheint ihr Vorhandensein zweifelhaft, denn sonst wäre eine Entwicklung von *Aspergillus* in der mit Kohle gereinigten Lösung, in der die Metallsalze als beseitigt angenommen werden müssen, unmöglich gewesen. Ein Ersatz von Zink durch Quecksilber kommt nach den Angaben von *Bortels* (6) ebenfalls nicht in Betracht. Solche Feststellungen müssen aber zunächst mit Vorbehalt gemacht werden, da unter Umständen bei einer weiteren Verfeinerung unserer chemischen Nachweismethoden eines Tages Quecksilberspuren in den zugesetzten Metallsalzen oder in der Nährlösung festgestellt werden könnten.

Zusammenfassend läßt sich über die Giftwirkung sagen: In Mengen unter 1 mg kann bei Phenol und Quecksilber eine Ertragssteigerung eintreten. In Konzentrationen unter 0,06 bis 0,08 % dient Phenol dem *Aspergillus niger* beim Fehlen anderer Kohlenstoffverbindungen auch als Kohlenstoffquelle. Gegenüber der stark schädigenden Wirkung von Phenol und Quecksilber in höheren Nitratgaben (8 %) übt Zink bei

doppelt so hohen Nitratmengen in größeren Gaben eine deutlich fördernde Wirkung auf das Wachstum von *Aspergillus* aus. Ferner tritt bei Phenol und Quecksilber in den Gaben, bei welchen das Wachstum während der gewöhnlichen Versuchsdauer (6 Tage) unterdrückt worden war, im Gegensatz zu Zink auch bei längerer Versuchszeit keine Entwicklung mehr auf.

6. Schlußbetrachtung.

Gestatten uns die Versuchsergebnisse zu der eingangs gestellten Frage, ob die Bezeichnung Nährstoffe und Giftstoffe zu Recht besteht, Stellung zu nehmen? Meines Erachtens bis zu einem gewissen Grade ja. Betrachten wir zunächst in Abb. 3b die N-Ertragskurven. Dort sehen wir, daß bei ungenugendem Vorhandensein von Zink in der Zn-Nullgabe schon bei 2 % Nitrat eine schädigende Wirkung auftritt. Bei einem besseren Gelingen der Kohlebehandlung wäre diese Wirkung sicher schon bei 0,5 % Nitrat aufgetreten, wie aus den Tabellen auf S. 45 hervorgeht. Durch Zugabe von 0,2 bis 2 mg Zinksulfat je 25 ccm tritt diese Hemmung erst bei mehr als 8 % Nitrat ein. Weitere Steigerungen der Zinkmengen bis 100 mg ermöglichten dem Pilz in diesem Versuch auch bei noch höheren Nitratgaben ein relativ gutes Wachstum. Erst eine nochmalige Steigerung des Zinksulfatzusatzes wirkt mehr hemmend als fördernd, und bei 150 mg ist schließlich die schädigende Wirkung größer als in der Zink-Nullgabe. Dieser Versuch bestätigt somit die alte Weisheit, daß ein *Nährstoff* (hier N) *auch Giftstoff* sein kann. Er zeigt uns weiter, daß das störende Übermaß von Stickstoff durch eine Steigerung von Zink innerhalb bestimmter Grenzen beseitigt werden kann, bis auch dieser Stoff, in zu großen Mengen zugeführt, zum Gift wird. Drittens geht aus diesem Beispiel noch hervor, daß die hemmende Wirkung nicht auf den absteigenden Ast beschränkt, sondern bereits in der Zink-Nullgabe einer Ertragskurve vorhanden ist, was wir ohne weiteres erkennen, wenn wir uns an Hand von Abb. 3b die entsprechenden Zink-Ertragskurven vorstellen. So sehen wir beispielsweise bei 8 % Nitrat, daß eine Gabe von 0,2 mg Zinksulfat den Ertrag von 200 mg auf 1000 mg und eine solche von 2 mg Zinksulfat auf rund das achtfache oder 1600 mg erhöht. Die Wachstumshemmung wird also nicht allein durch zu hohe Konzentrationen eines Stoffes verursacht, sondern auch ein zuviel oder zuwenig der übrigen Bestandteile der Nährlösung in bezug auf den variierten Stoff, mit anderen Worten ein unharmonisches Verhältnis der Bestandteile der Nährlösung genügt zu einer hemmenden Wirkung, die bei extremeren Bedingungen zur Giftwirkung werden kann.

Bezeichnen wir nun jede Hemmung, ob groß oder klein, ob vorübergehend oder dauernd, ohne Rücksicht auf den sie bewirkenden

Stoff, als Giftwirkung, entsprechend der in der Einleitung gegebenen Begriffsbestimmung, dann müssen wir folgerichtig jede das Wachstum fördernde oder ermöglichende Wirkung, wieder ohne Rücksicht auf die Größe der eingetretenen Wirkung, als Nährstoffwirkung bezeichnen. Somit wäre Phenol, ein *Giftstoff*, auf Grund der Nullbedingung und des Wachstums bei 3 und 5 mg — wie im vorhergehenden Kapitel mitgeteilt wurde — *auch Nährstoff*. Diese Umkehrung der obigen Schlußfolgerung aus Abb. 3b konnte ich allerdings nirgends ausgesprochen finden. Vielleicht kommt das davon, daß die Begriffsbestimmung fur Gift von in erster Linie am Studium der Giftwirkung interessierten Kreisen, Hygiene und Pharmakologie usw., stammt. Phenol ist aber keineswegs der einzige bis jetzt bekannte Fall, daß ein sogenannter Giftstoff auch Nährstoff sein kann. Als weiteres Beispiel sei der Alkohol erwähnt. In etwa 50 %iger Konzentration verwenden wir ihn zur Abtötung von Pilzen und Bakterien, unter etwa 14 Gewichtsprozent hindert er Hefen im Wachstum nicht, in noch geringerer Konzentration dient er den *Essigbakterien* fur ihren Betriebsstoffwechsel, und schließlich kann er auch als Kohlenstoffquelle dienen. So soll *Aspergillus niger* nach *Bokorny* (3) (31) Alkohol assimilieren, und der Schimmelpilz *Eurotiopsis Gayoni* wächst nach der gleichen Angabe mit Vorliebe auf Alkohol.

Im Gegensatz zu den beiden genannten Zweigen der Wissenschaft, Hygiene und Pharmakologie, von denen der erste nur an der Unterdruckung des Wachstums interessiert ist, hat sich ein anderer Zweig besonders mit der Forderung des Wachstums, also auch mit der Nährstofffrage, befaßt, nämlich die Pflanzenphysiologie. Außer der Nullbedingung wurden für N und P noch weitere Nährstoffmerkmale aufgestellt, die zum Teil auch fur Zink gelten, wie gezeigt wurde. Ob und inwieweit diesen Merkmalen die gleiche Bedeutung zukommen wird wie der Nullbedingung, kann naturlich erst nach Untersuchung weiterer Elemente gesagt werden. Hinsichtlich der Wirkung sogenannter Giftstoffe, die in dieser Arbeit zum ersten Male ebenfalls bei den Ertragsgesetzstudien berucksichtigt wurden, konnte im absteigenden Ast streng genommen nur ein gradueller Unterschied festgestellt werden. Ganz unberucksichtigt ist aber bis jetzt die Frage geblieben, ob bei den oben erwähnten Verbindungen: Phenol, Alkohol und ähnlichen Stoffen, nicht die gleichen Gesetzmäßigkeiten (Maximumverschiebung mit zunehmender Konzentration oder Wachstumszeit usf.) auftreten. Sollte es gelingen, diese Gesetzmäßigkeiten auch hier nachzuweisen, dann wäre dies nur ein weiterer Beweis, daß die Bezeichnungen Nährstoff und Gift den wirklichen Verhältnissen nicht entsprechen, sondern daß es vielleicht besser ist nur von einer Nähr- und Gift*wirkung* zu sprechen. Die endgültige Entscheidung darüber kann aber erst nach sehr vielen weiteren Untersuchungen getroffen werden.

7. Zusammenfassung.

Nachdem die Lebensnotwendigkeit von Zink, Eisen und Kupfer für gewisse Organismen festgestellt worden war, interessierte die Frage, ob die Ertragskurven dieser Stoffe die gleiche typische Form wie eine Stickstoffertragskurve haben, und ob die gleichen Gesetzmäßigkeiten wie bei Stickstoff und Phosphorsäure vorhanden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde von diesen Stoffen Zink näher untersucht. Die erhaltenen Ertragskurven stellen in überwiegender Mehrheit Sattelkurven dar und unterscheiden sich demnach von den entsprechenden N-Ertragskurven. Die Nährstoffwirkung kommt, abgesehen von der auch von anderer Seite festgestellten Nullbedingung, in einer Verschiebung des Maximums bei geringen, steigenden Zinkgaben (unter 0,2 mg $ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$/25 ccm Nährlösung) und in einer Rückläufigkeit desselben bei hohen Zinkmengen (über 130 mg je 25 ccm) zum Ausdruck. Eine eindeutige Maximumverschiebung in Abhängigkeit von der Entwicklungszeit nach höheren Zinkkonzentrationen konnte vorerst bei keinem der beiden Maxima festgestellt werden.

Der absteigende Ast, in dem die Giftwirkung überwiegt, hat bei Zink in Übereinstimmung mit Stickstoff und Phosphor einen Wendepunkt. Dieser Wendepunkt konnte auch in den Ertragskurven sogenannter Giftstoffe, nämlich bei Phenol und Sublimat, beobachtet werden, einwandfrei allerdings nur, wenn das Wachstum noch nicht zu weit fortgeschritten war. Bei den genannten drei Stoffen konnte ein grundsätzlicher Unterschied im Verhalten des absteigenden Astes nicht festgestellt werden. Doch zeigte sich ein solcher insofern, als mit fortschreitender Entwicklungszeit das Wachstum auch bei höheren Gaben von Zink einsetzte, die innerhalb der normalen sechstägigen Versuchszeit die Entwicklung verhindert hatten. Bei Quecksilber und Phenol dagegen war in den Gaben, die während der normalen Versuchszeit ohne Wachstum geblieben waren, auch nach dreimonatiger Beobachtungszeit ein solches nicht eingetreten. Ein weiterer Unterschied bestand darin, daß bei Zink, ebenso wie bei Kalium, Phosphor und Stickstoff, eine bei geringer Höhe des variablen Faktors und relativ hohen Gaben der Grundfaktoren in Erscheinung tretende Hemmung bei Besserstellung des variablen Faktors verschwindet, während bei Stoffen wie Phenol und Quecksilber diese schädliche Wirkung im entsprechenden Falle offenbar noch stärker in Erscheinung tritt.

Der einwandfreie Nachweis, welche Momente in der Ertragskurve charakteristisch für eine Nährstoff- oder eine Giftwirkung sind, ist jedoch noch nicht geglückt.

8. Literatur.

1) *E. Abderhalden*, Lehrbuch der physiologischen Chemie, in Vorlesungen, 6. Aufl., 1931. Berlin-Wien, Urban u. Schwarzenberg.

2) *W. Benecke* u. *L. Jost*, Pflanzenphysiologie 2. Jena, Fischer, 1924. — 3) *Th. Bokorny*, Centralbl. f. Bakt. II, 47, 204, 1917. — 4) *K. Boresch*, Gesamtumsätze bei Pflanzen, insbesondere bei den autotrophen. Handb. d. norm. u. pathol. Physiol. 5. Berlin, Springer. — 5) *Derselbe*, Über Ertragsgesetze bei Pflanzen. Ergebn. d. Biol. 4. Berlin, Springer, 1928. — 6) *H. Bortels*, Biochem. Zeitschr. 182, 301, 1927. — 7) *E. Burri*, Arznei und Gift. Nach einem akademischen Vortrag des Verfassers. Bern, Buchdruckerei Jent, 1906.

8) *W. Estor*, Centralbl. f. Bakt. II, 72, 411, 1927.

9) *E. Fröhner*, Lehrbuch der Toxikologie für Tierärzte. Stuttgart, Enke, 1927.

10) *M. Gutstein*, Centralbl. f. Bakt. I, 124, 502, 1932.

11) *W. Heubner*, Nahrung und Gift. Festrede zur Feier der Georg-August-Universität am 20. Juni 1928 in Göttingen. — 12) *K. A. Hofmann*, Lehrbuch der anorganischen Chemie. Braunschweig, Vieweg, 1928.

13) *F. Kögl* u. *A. J. Hagen Smit*, Koninklijke Akademie van Wetenschappen Te Amsterdam. Proceedings 34, Nr. 10, 1, 1931.

14) *O. Metz*, diese Zeitschr. 1, 237, 1930. — 15) *R. Meyer*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkde. A. 10, 329, 1927/28. — 16) *Derselbe*, Biochem. Zeitschr. 198, 463, 1928. — 17) *Derselbe*, ebenda 199, 171, 1928. — 18) *Derselbe*, ebenda 209, 62, 1929. — 19) *Derselbe*, diese Zeitschr. 1, 277, 1930. — 20) *Fr. Moll*, Centralbl. f. Bakt. II, 51, 257, 1920.

21) *A. Rippel*, Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen. 3. Heft der Sammlung „Naturwissenschaft und Landwirtschaft", Verlag Dr. F. P. Datterer u. Co., Freising-München, 1925. — 22) *Derselbe*, Das Ertragsgesetz. Handbuch der Pflanzenernährung und Düngerlehre 1. Berlin, Springer, 1931. — 23) *A. Rippel* u. *R. Meyer*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkde., Teil A, 14, 1, 1929. — 24) *Dieselben*, ebenda Teil A, 27, 257, 1933. — 25) *M. Roberg*, Centralbl. f. Bakt. II, 74, 333, 1928. — 26) *Derselbe*, ebenda 84, 196, 1931. — 27) *E. Rost*, Ber. d. Deutsch. pharm. Ges. 29, 549, 1919.

28) *K. Skumburdis*, Kolloidzeitschr. 44, 127, 1928. — 29) *Derselbe*, ebenda 55, 150, 1931. — 30) *R. A. Steinberg*, Amer. J. Bot. 6, 330, 1919.

31) *H. Tamiya*, Acta Phytochimica 6, Nr. 1, 1932. — 32) *P. F. Treadwell*, Kurzes Lehrbuch der analytischen Chemie 2. Leipzig u. Wien, Deuticke, 1923.

(Aus dem botanischen Institut der Universität Innsbruck.)

Beiträge zur Ökologie von Bacillus mycoides (Flügge).

(Nach Untersuchungen im Hochgebirge.)

Von

Ernst Grundmann.

Mit 5 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. August 1933.)

In der ökologischen Bakterienforschung, die doch zweifellos für die Erkenntnis vieler Lebensvorgänge in der Natur von Bedeutung ist, hat man bisher, wie auch *Bavendamm* (1) betont, meist nur einige chemische Zusammenhänge studiert (2), oder man hat Untersuchungen über Keimzahlschwankungen und deren Abhängigkeit, ohne Rücksicht auf einzelne Bakterienarten (3, 4), gemacht. Es ist verständlich, daß für die Praxis und zur Erklärung größerer biologischer Probleme immer wieder die chemische Tätigkeit der Bakterien berucksichtigt wird; denn es ist ja nur die Arbeit der Bakterien, die tatsächlich in Erscheinung tritt, nie das Individuum als solches. Wohl gibt es Arbeiten, die sich mit der Ökologie einzelner Bakterienarten befassen, den Stickstoffsammlern z. B. Aber auch hier ist es wieder die Praxis der Landwirtschaft, die dem Menschen ein Interesse an solchen Arbeiten aufgezwungen hat. Auch die Ökologie der Eisen- und Schwefelbakterien ist näher studiert worden, hauptsachlich wohl, weil es relativ einfach war durch die engumgrenzten Lebensmöglichkeiten. Auch die neueren Untersuchungsmethoden gehen darauf aus, Keimzahlen allgemein zu erfassen und nicht die einer Spezies im besonderen (5, 6).

Und doch kann es auch von Wichtigkeit für das Erfassen von Lebensvorgängen sein, wenn einzelne Arten, besonders solche, die für den Chemismus einer Gruppe als Prototyp gelten können, in ihrer Ökologie, besonders in ihrer Verbreitung, genauer untersucht werden. Vielleicht läßt sich doch die Aufeinanderfolge von chemischen Vorgängen im Kreislauf der Stoffe in der Natur einwandfreier und klarer erkennen, wenn man weiß, welche Individuen unter der Einwirkung bestimmter Faktoren an der Umsetzung der Substanzen arbeiten.

In der vorliegenden Arbeit ist nun der Versuch gemacht worden, zunächst die Verbreitung für eine bestimmte Bakterienart zu bestimmen, und zwar für *Bacillus mycoides*, Wurzelbazillus, *Bacillus ramosus*. *B. mycoides*, der bisher als „sehr gemein im Boden" bezeichnet worden ist (7), spielt im Stickstoffkreislauf der Natur, wie oft betont worden ist (8), eine große Rolle. Er gilt als ein typischer Umsetzer stickstoffhaltiger organischer Substanz, die er bis zum Ammoniak abbaut. Die Arbeiten über die allgemeine Verbreitung wurden sehr erleichtert durch die Bodenverteilung im *Hochgebirge*. Denn im Hochgebirge ist es eher möglich, scharfe Grenzen zwischen Dungböden, dungfreien Böden und Vegetationsbedeckung auf kleineren Räumen zu finden als im Flachland, wo durch die leichte Möglichkeit der Bodenbearbeitung diese Bodenformen und die Vegetationen mehr oder weniger ineinander übergehen. Unter dungfreien Böden wird der bisher weder durch Abgänge höherer Tiere und des Menschen gedüngte noch von Menschen bearbeitete Boden verstanden. Mit Dungboden soll jeder Boden bezeichnet werden, der die genannten Abgänge irgendwie, z. B. beim Weidegang der Tiere, aufgenommen hat oder vom Menschen bearbeitet worden ist.

Um festzustellen, wie die Keimzahlen des *B. mycoides* im Boden schwanken, wann er vegetativ tätig ist, und wann er Sporen bildet, wurden Untersuchungen im Laufe eines Sommers an bestimmten Standorten durchgeführt. In diesem zweiten Teil der Arbeit wird auch zwischen der Rauh- und der Glattform des *Mycoides* unterschieden, was leider infolge von Unkenntnis von dem Vorhandensein einer Glattform im ersten Teil der Arbeit nicht geschehen konnte.

Im dritten Teil der Arbeit wurde, um einen vielleicht bestehenden Unterschied zwischen Stämmen verschiedener Herkunft festzustellen, die Abhängigkeit des Wachstums verschiedener *Mycoides*-Stämme von mehreren Stickstoffquellen bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösung untersucht, und zwar nur das *quantitative Wachstum*, denn die chemischen Leistungen sind schon oft Gegenstand von umfangreichen Untersuchungen gewesen. Dazu wurde die Methode benutzt, wie sie von mir in der Arbeit: „Ein Verfahren zur quantitativen Gewinnung von Bakterientrockensubstanz aus flüssigen Nährmedien" (11), beschrieben worden ist.

1. Die Verbreitung des Bacillus mycoides im Hochgebirge.

Untersuchungsmethoden.

Die Untersuchung der Bodenproben auf *B. mycoides* ist durch seine charakteristische, fast schimmelpilzartige Koloniebildung auf Agar sehr erleichtert. Es wurden 263 Bodenproben von verschiedenen Standorten untersucht, ohne zunächst Rücksicht darauf zu nehmen, welche Faktoren für die Verbreitung maßgebend sind. Die Entnahme der Bodenproben erfolgte mit einer Messingröhre nach dem Prinzip des Korkbohrers. Der Bohrer wurde einige Zeit vor dem Gebrauch jedesmal in 96 %igen Alkohol gesteckt, der haften gebliebene Alkohol abgebrannt, so daß eine ziemlich

gute Sterilität gewahrt wurde. Der Boden wurde aus dem Bohrer in einen sterilen Stoffhalter gedrückt. Sobald als möglich wurde mit einem sterilen Hohlmaß der Boden in sterile 0,85%ige Kochsalzlösung gegeben und 24 Stunden geschüttelt, die Aufschwemmung dann in gleichen Mengen auf Agar (Zusammensetzung: 1000 ccm H_2O, 5 g NaCl, 10 g Liebig Fleischextrakt, 10 g Pepton *Witte*, 20 g Agar) verimpft. Die Zählung der Kolonien auf den Agarplatten erfolgte nach einer Bebrütung bei 29° C 24 bis 30 Stunden nach der Verimpfung. Da jedesmal bei allen Untersuchungen die gleichen Mengenverhältnisse gewahrt wurden, nämlich $^1/_2$ ccm Boden auf 20 ccm 0,85%iger Kochsalzlösung und davon je Platte 1 ccm, und da man, wie erwähnt, auch zunächst auf bestimmte Faktoren keine Rücksicht genommen hatte, konnten je nach dem Keimgehalt der gegossenen Agarplatten nur Angaben mit Häufigkeitsgraden gemacht werden. Es blieb dann ein Spielraum für etwaige Schwankungen im Keimgehalt durch Jahreszeit und Feuchtigkeit.

Es entsprechen einem Häufigkeitsgrad eine bestimmte Anzahl Keime auf den Platten, die immer in der Dreizahl gegossen wurden:

Keime	Häufigkeitsgrad
0	0
1— 3	2
3— 5	4
5—10	7
15—20	17
20—30	25
30—40	30
über 40	40

Als einziger äußerer Faktor wurde die Wasserstoffionenkonzentration der Standorte bestimmt, weil diese Bestimmung leicht und schnell vor sich gehen konnte. Die Bestimmungen wurden mit dem *Merck*schen Universalindikator gemacht. Bei Versuchen mit der von *Hoss* (9) ausgearbeiteten Überschichtungsmethode (Feldmethode), die, erst 1932 veröffentlicht, für diese 1931 angestellten Untersuchungen noch nicht verwendet werden konnte, ergab sich, daß der *Merck*sche Universalindikator bei den niedrigen p_H-Werten, etwa von 6,8 an, nicht einwandfrei zu arbeiten schien. Denn mit der Überschichtungsmethode wurden für saure Böden bedeutend niedrigere Werte festgestellt, und die *Hoss*sche Methode scheint gerade im sauren Bereich ziemlich einwandfrei zu arbeiten, weil durch die verschiedenen Indikatoren, die benutzt werden können, um die Bestimmungen auszuführen, die Fehlermöglichkeit stark eingeschränkt ist.

Die Proben stammen vom Karwendelgebirge (Kalk), aus den Tuxer Vorbergen und den Stubaier Alpen (Urgestein).

Untersuchungsergebnisse.

Als erstes klares Ergebnis der Untersuchungen trat ein deutlicher Unterschied in der Keimzahl zwischen den Dungböden und den dungfreien Böden hervor. In den Dungböden ist durchschnittlich die 4 bis 5fache Keimzahl der Naturböden enthalten (Abb. 1). Woher dieser Unterschied in der Häufigkeit kommt, läßt sich aus den bisher bekannten

chemischen Leistungen des *B. mycoides* nicht ohne weiteres erschließen, doch ist anzunehmen, daß es irgendwelche Komponenten oder Zersetzungsprodukte tierischer Exkremente sind, die ihm besonders zusagen.

In den höheren Lagen, wo nur eine Beweidung möglich ist, hängt die Verbreitung des *B. mycoides* von der Beweidung ab. Diese ist im Urgebirge eine andere als im Kalkgebirge, was durch die Gebirgsform bedingt ist. Das Urgebirge hat im Gegensatz zum Kalkgebirge große ausgedehnte Almen, die für das Großvieh bisweilen bis 2600 m zugänglich sind. Darüber ist aber meist noch Beweidung bis an die Gletscher durch Schafe möglich. Im Kalkgebirge gehen die Großvieh-

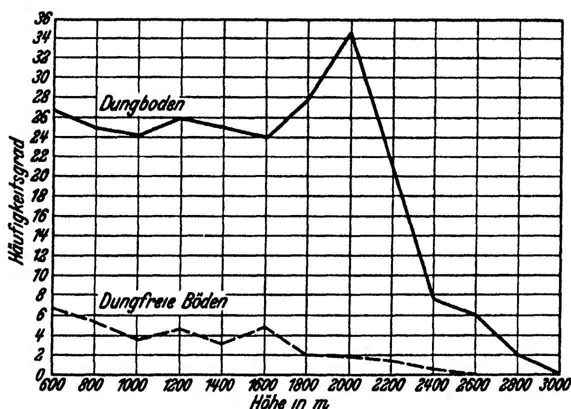


Abb. 1

Die Häufigkeit des Vorkommens von *Bac mycoides* in Dungböden und dungfreien Böden.

almen durchschnittlich nur bis 2000 m, die Schafweide erreicht in einzelnen Teilen Höhen bis 2300 m und teilweise darüber hinaus, bis etwa 2500 m sind größere Herden von Gemsen zu finden. So wurden denn auch für das Kalkgebirge andere Grenzen für das Vorkommen von *Bac. mycoides* festgestellt wie für das Urgebirge. Die höchstentnommene Probe vom Kalk, die noch *Mycoides* enthielt, stammte aus einer Hohe von 2550 m; 13 Proben aus den verschiedenen Gegenden über 2550 m enthielten den Bazillus nicht mehr. Im Urgebirge wurde die letzte *Mycoides* enthaltende Probe in einer Höhe von 2900 m entnommen. Diese Proben stammen von beweideten Böden. Im Kalk gibt es an dem Standort (Bettelwurf) viele Gemsen, Schafe schon nicht mehr. Am Brandjoch, 2450 m (Kalk), wohin weder Schafe noch Gemsen kommen, wurde in 5 Proben über 2300 m kein *Mycoides* mehr gefunden. Der Standort im Urgebirge (Rinnennieder) liegt dicht am Gletscher, zeitweilig gehen Schafe dort hinauf. Unter 7 Proben aus dieser Höhe von verschiedenen Gegenden wurde er nur einmal gefunden, und zwar

dort, wohin Schafe kommen. Oberhalb der Gletscher wurden 20 Proben entnommen, die alle keinen *Mycoides* enthielten. Aus diesen Ergebnissen ist die Abhängigkeit von der Beweidung zu erkennen.

Bei eingehender Betrachtung der Ergebnisse aus den Weidegebieten kann man auch eine Abhängigkeit von der Art der Weide (Großviehweide und Schafweide) erkennen. Die Kurven für Dungböden auf Abb. 2 zeigen, daß bei 2000 m ein Häufigkeitsmaximum besteht. Um 2000 m liegen auf Kalk und Urgestein die meisten Großviehalmen. Leider liegen für Kalk bei 2200 m keine Zahlenwerte vor, aber aus dem Verlauf der Kurven darf man schließen, daß sie unter denen für Urgestein liegen, weil in dieser Höhe kaum noch Großvieh-

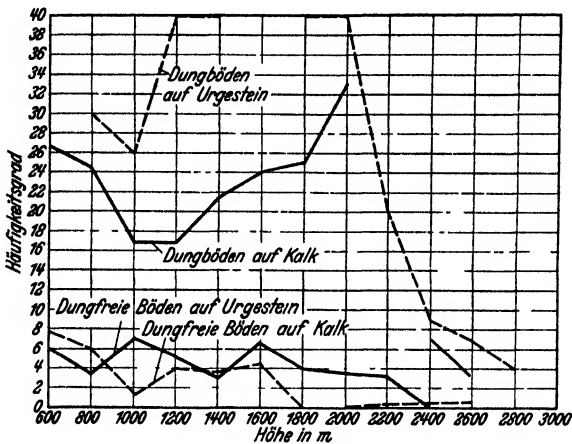


Abb. 2

Die Verbreitung des *Bac. mycoides* in Dungböden und dungfreien Boden mit Kalk und Urgestein als Unterlage.

almen zu finden sind im Gegensatz zum Urgebirge, wo sie bis 2400 m und teilweise noch höher hinauf reichen. Bei 2400 m ist der Wert für Kalk niedriger als für Urgestein, und der Unterschied wird bei 2600 m noch größer. Die größere Masse der Schafe hält sich auf den Weiden um 2800 m auf, daraus ist der verhältnismäßig hohe Häufigkeitsgrad bei 2600 m und 2800 m zu erklären.

Der Verlauf der Kurven in den *niederen* Höhenlagen erklärt sich durch die Herkunft der Proben. In Waldböden ist auch hier der Häufigkeitsgrad von der Beweidung abhängig. Waldböden, die selten stark beweidet sind, haben immer niedrigere Häufigkeitsgrade; in unbeweideten Waldböden ist *Mycoides* selten gefunden worden. Die Proben von Kalk stammen meist aus Wald, besonders von 1000 m bis 1200 m, bei 600 m und 800 m allerdings von Wiesen und Äckern, von 1600 m ab von Almen. Die Proben von Urgestein stammen bei 800 m von Wiesen

und Äckern, bei 1000 m von Waldböden, bei 1200 m und 1400 m von Almwiesen im Oberbergtal, bei 1600 m fehlen Proben, bei 1800 m wieder von Almboden.

Demgegenuber zeigt die Kurve fur dungfreie Böden, abgesehen von kleinen Schwankungen, mit zunehmender Hohe eine stetig fallende Tendenz. Eine starke Ähnlichkeit haben die Kurven fur dungfreie Boden (Abb 2 und 3), wo einerseits Bezug genommen ist auf Herkunft

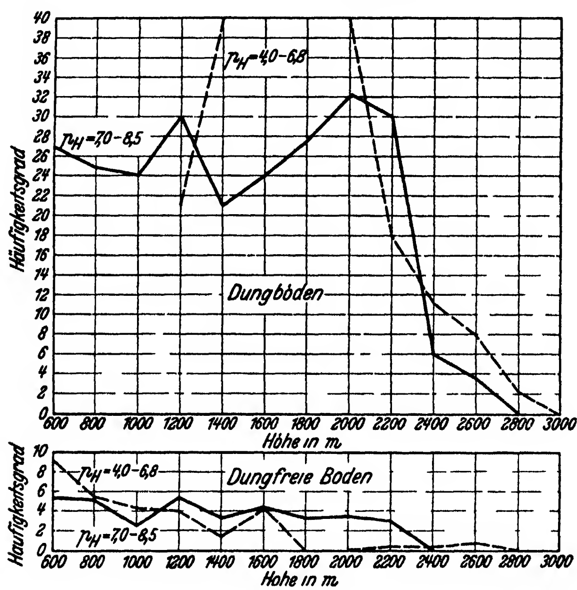


Abb. 3.
Die Verbreitung des *Bac. mycoides* in Dungboden und dungfreien Boden in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Bodens

von Kalk und Urgestein, andererseits auf die Reaktion des Bodens. Ist im Vorhergehenden eine Abhängigkeit von der Beweidung zu sehen gewesen, so ergibt sich aus dem Verlauf dieser Kurven doch auch eine Abhangigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Bodens. Denn dadurch, daß in den unteren Höhenlagen die Vegetation und deren Ablagerungen die Reaktion der oberen Schicht von der Unterlage vollig unabhangig machen, kann sie im Urgesteinsboden alkalisch sein und im Kalkboden sauer. In höheren Lagen ist die durch die Vegetation gebildete Schicht und deren Einfluß bedeutend geringer, da sie immer mehr an Machtigkeit abnimmt, also der Einfluß der Unterlage immer größer wird, die Reaktion mehr der der Unterlage gleichkommt. Das dürften die Grunde dafur sein, daß die Kurven bis 1800 m nur ungefähr ähnlich und über 1800 m fast gleich verlaufen. Der Häufigkeitsgrad für Urgestein bzw. fur die saure Reaktion liegt zum größten Teil unter

dem für Kalk bzw. für alkalische Reaktion. Während die Kurve für dungfreie Böden auf Kalk erst bei 2400 m auf 0 sinkt, ist das bei der für Urgesteinsböden schon bei 1800 m der Fall. Das leichte Ansteigen und Übersteigen dieser Kurve von 2200 bis 2600 m läßt sich nicht direkt erklären. Unter 23 Proben aus diesen Höhen enthielten 3 den *Mycoides* mit der Häufigkeit 2. Diese Böden sind verdächtig, durch Menschen hin und wieder verunreinigt zu sein, da sie von einem stark begangenen Berggipfel stammen. Aus diesen Kurven kann man eine gewisse Abhängigkeit vom p_H erkennen. In sauren ungedüngten Böden ist der Häufigkeitsgrad und die Höhengrenze für *Mycoides* niedriger als in alkalischen ungedüngten Böden. In Dungböden zeigt, wie zu erwarten war, die Verbreitung des *Mycoides* keine Abhängigkeit von der Unterlage und von der Reaktion. Sind genug Nährstoffe vorhanden, so ist ihm die Reaktion gleichgültig.

Bei allen vorangehenden Ergebnissen sind nur die Proben berücksichtigt, die von Böden stammen, welche mit Vegetation bedeckt waren. Durch das Einbeziehen von Proben vegetationsloser Böden würden die Ergebnisse unklar werden. Von 37 Proben ohne Vegetationsbedeckung aus allen Höhen innerhalb der Hohengrenzen enthielten nur 9 den *Mycoides* mit dem Haufigkeitsgrad 2. Alle 9 Proben wiesen aber Reste organischer Substanz auf.

Fast sämtliche Proben wurden im Sommer 1931 gesammelt, lediglich 20 Proben aus dem Urgestein oberhalb der Gletscher erst im Sommer 1932. Da mir bis dahin die Glattform des *B. mycoides* noch nicht bekannt war, wurde nur die Verbreitung der Rauhform berücksichtigt. In einer Probe aus einer beweideten Wiese am Bettelwurf wurde auch *Bac. mycoides citreus* gefunden.

Aus den bisherigen Untersuchungen laßt sich also, kurz zusammengefaßt, erkennen, daß die Verbreitung des *B. mycoides* von der Düngung durch hohere Tiere und von der Bearbeitung des Bodens durch den Menschen abhangig ist, und daß die Hohengrenzen mit den Beweidungsgrenzen übereinstimmen. Eine Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration des Bodens und der Unterlage ist bei Dungböden nicht festzustellen, während bei dungfreien Böden eine solche Abhängigkeit vorhanden zu sein scheint. In vegetationslosen Böden kommt *B. mycoides* nicht vor, wenn nicht mindestens Reste organischer Substanz vorhanden sind.

Die Verbreitung des Bazillus in Abhängigkeit von den Tieren kann man auf verschiedene Art erklären. Einmal können die Tiere ihn durch ihren Körper von Ort zu Ort verbreiten, zum anderen kann der Bazillus auch mit den Exkrementen der Tiere verbreitet werden. Jedenfalls aber schaffen die Tiere durch ihre Exkremente für den Bazillus günstige Lebensbedingungen, sei es durch die stoffliche Zu-

sammensetzung der Exkremente selbst oder durch die Veränderung der chemischen Zusammensetzung und des physikalischen Zustandes des Bodens.

2. Untersuchungen über die Keimzahlschwankungen an ein und demselben Standort.

Im Sommer 1931 waren die Untersuchungen über die Verbreitung des *B. mycoides* ganz allgemein und ohne Rücksicht auf irgendwelche Faktoren angestellt worden. Im Sommer 1932 wurden Versuche angestellt, die erkennen lassen sollten, von welchen Faktoren die Keimzahlschwankungen des *Mycoides* an bestimmten Standorten abhängig sind, in welchen Grenzen sie sich bewegen, und wie das p_H des Bodens sich im Laufe eines Sommers ändert. Ferner sollte festgestellt werden, ob der *B. mycoides* sich zu einem bestimmten Zeitpunkt in Sporenform oder im vegetativen Zustande im Boden vorfindet, und inwieweit die jeweilige Zustandsform von Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration des Bodens und von anderen Faktoren abhängig ist. Dabei fiel erstmalig der Unterschied zwischen den beiden Kolonieformen des *Mycoides*, der Rauh- und der Glattform (10), auf.

Die Methode für diese Untersuchungen mußte wegen der wirtschaftlichen Verhaltnisse möglichst einfach und mit möglichst wenig Kosten verbunden sein.

Die Frage, in welcher Form der *Mycoides* im Boden vorhanden ist, ob in vegetativer oder in sporulierter, sollte mit Hilfe der Tatsache gelöst werden, daß Sporen eine größere Widerstandsfahigkeit gegen Hitze zeigen als vegetative Formen. Es mußte die Zeit und die Temperatur gefunden werden, in der die vegetativen Formen abgetötet, die Sporen aber nicht beschädigt werden. Zu diesem Zwecke wurden folgende Versuche angestellt:

Von einer alten Agarkolonie des *Mycoides*, die vollkommen aus Sporen bestand, wurde eine Aufschwemmung in 0,85 %iger Kochsalzlösung gemacht. Von dieser Aufschwemmung wurden zunächst mit bestimmter Menge Agarplatten beimpft, dann wurde die Aufschwemmung erhitzt, und zwar 12 Minuten lang auf 75°, und wieder dieselbe Menge auf Agarplatten verimpft. Dieser Versuch hatte folgendes Ergebnis:

Nicht erhitzte Aufschwemmung:		Erhitzte Aufschwemmung:	
Platte 1	28 Keime	Platte 1	26 Keime
„ 2	34 „	„ 2	26 „
„ 3	24 „	„ 3	29 „
Durchschnitt	28,6 Keime	Durchschnitt	27 Keime

Der Unterschied im Durchschnitt von 1,6 Keimen dürfte innerhalb der Fehlergrenze beim Plattenguß liegen. Derselbe Versuch mit denselben Bedingungen wurde nun mit einer ganz jungen, noch nicht sporulierten Kultur gemacht. Das Ergebnis war: Nicht erhitzte Aufschwemmung: auf allen Platten etwa 100 bis 120 Keime; erhitzte Aufschwemmung: nach 3 Tagen wachsen 1 bis 3 Keime.

Der Fehler ist auch hier sehr klein, zumal die Platten nicht erst nach 3 Tagen, sondern schon nach 24 Stunden gezählt werden sollten. Nach diesen Vorversuchen war die Möglichkeit der Beurteilung, ob *Mycoides* im Boden in Sporen oder in vegetativer Form vorhanden war, gegeben. Es mußte nur darauf geachtet werden, daß die Bodenproben möglichst schnell nach der Entnahme verarbeitet werden, um eine Veränderung irgendwelcher Art zu vermeiden. Die Entnahme geschah in der schon beschriebenen Art und Weise mit dem korkbohrerähnlichen Instrument.

Die Standorte wurden auf der Nordkette und auf dem Patscherkofel gewählt. Durch die Benutzung der Bergbahnen Innsbrucks, der Nordkettenbahn und der Patscherkofelbahn, konnten die Proben auf dem schnellsten Wege zum Laboratorium befördert werden. Dort wurden sie sofort weiter verarbeitet, indem mit einem sterilen Hohlmaß (Fassungsvermögen 1 ccm) der Boden in 20 ccm sterile, 0,85%ige NaCl-Lösung gebracht und dann $2^1/_2$ Stunden geschüttelt wurde. Durch Vorversuche mit Aufschwemmungen von Agarkulturen wurde mikroskopisch festgestellt, daß nach $2^1/_2$stündigem Schütteln eine Veränderung der vegetativen Zellen nicht eintrat. Um möglichst gleichmäßige Aufschwemmungen zu verarbeiten, wurden diese nach dem Schütteln durch ein steriles Messingdrahtnetz gegossen. Es konnte durch das Zurückhalten des Bodens von einer bestimmten Korngröße ab zwar hier ein Fehler eintreten, der aber bei allen Proben gleich war und bei den Ergebnissen der Untersuchungen keine Rolle spielen konnte, da es weniger auf die relativen Zahlen für das Vorhandensein des *Mycoides* ankam als vielmehr auf die Veränderung der Zahlenverhältnisse. Die Platten wurden immer mit 0,5 ccm dieser Aufschwemmung besät. Als Nährboden wurde Agar genommen (Zusammensetzung: wie auf S. 59 oben angegeben). Dann wurden die Aufschwemmungen 12 Minuten lang auf 75° erhitzt und wieder 0,5 ccm je Platte ausgesät. Nach 24stündigem Bebrüten bei 30° wurden die Platten gezählt. Auf den Platten, die mit nicht erhitzter Aufschwemmung besät wurden, wurde also die Gesamtmenge des *Mycoides* gezählt, d. h. die Sporen und vegetativen Formen gemeinsam, und auf den mit erhitzter Aufschwemmung besäten Platten nur die Sporen. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen beider Platten mußte die Zahl der vegetativen Formen ergeben.

Die p_H-Bestimmungen wurden gleich am Standort nach der Feldmethode von *Hoss* vorgenommen.

Die Standorte auf dem Patscherkofel lagen auf der Nordseite in einer Höhe von etwa 2050 m, auf der Südseite in einer Höhe von etwa 2150 m. Auf der Nordkette lagen sie westlich von der Bergstation Hafelekar in einer Höhe von 2300 m. Die Standorte des Südhanges und des Nordhanges waren hier nur 8 bis 10 m voneinander entfernt. Sie lagen auf der Nord- bzw. Südseite eines kleinen Grates. Jeder Standort am betreffenden Hang war vom anderen mindestens 3 bis 4 m entfernt.

Patscherkofel, Nordhang.

Standort I. Vegetation: Dichtes Polster von *Loiseleuria*, untermischt mit *Vaccinium*. Boden: Humus.

Standort II. Vegetation: Polster von *Loiseleuria* und *Vaccinium*. Boden: Humus.

Standort III. Vegetation: Im Umkreis von 40 bis 60 cm keine; in dieser Entfernung *Rhododendron ferrugineum*, *Loiseleuria*, *Vaccinium*. Boden: Humus mit Sand durchsetzt.

Patscherkofel, Südhang.

Standort IV. Vegetation: *Vaccinium* mit *Calluna* durchsetzt, dicht dabei *Rhododendron ferrugineum.* Boden: Stark mit Blättern durchsetzter Humus.

Standort V. Vegetation: *Calluna* mit vereinzeltem *Vaccinium.* Boden: Humus.

Standort VI. Vegetation: Einige *Flechten,* sonst im Umkreis von 20 bis 30 cm keine Vegetation, dicht darüber *Rhododendron ferrugineum, Calluna, Vaccinium.* Boden: Humus.
Von Zeit zu Zeit werden die Standorte von Vieh aufgesucht.

Hafelekar, Nordhang.

Standort I. Vegetation: Sehr dichtes und dickes Polster von *Dryas.* Boden: Humus, mit vielen Wurzeln von *Dryas* durchsetzt.

Standort II. Vegetation: Polster von *Dryas,* verkümmertes *Rhododendron hirsutum.* Boden: Ziemlich dicke Schicht Humus.

Standort III. Vegetation: Dickes Polster von *Dryas.* Boden: Humus mit vielen Wurzelresten von *Dryas.*

Hafelekar, Südhang.

Standort IV. Vegetation: Einige Flechten, im Umkreis von etwa 60 cm, *Dryas, Saxifraga,* sonst viel Fels. Boden: Steiniger Sand.

Standort V. Vegetation: *Saxifraga Aizoon.* Boden: Sehr dünne Schicht steiniger Humus.

Standort VI. Vegetation: *Salix* und *Saxifraga Aizoon.* Boden: Fetter Humus dicht an einem Felsen, von dem das Wasser auf den Standort abläuft.

Die Vegetation ist auf dem Patscherkofel zusammenhängend, am Hafelekar sind es von kahlen Felsen durchbrochene Vegetationsinseln. Die Unterlage am Patscherkofel ist Urgestein, am Hafelekar Kalk. Am Patscherkofel werden die Standorte hin und wieder von Tieren beweidet. Zu den Standorten des Hafelekars kommen öfter Menschen.

Bei der ersten Probeentnahme am Hafelekar am 27. Juli fielen auf den Platten Kolonien von Stäbchenbakterien auf, die mikroskopisch anfangs wie *Bac. mycoides* aussahen, dann aber immer mehr die typische verzweigte Form verloren und schließlich in eine vollkommen unverzweigte Kolonieform übergingen. Daneben gab es Formen, die bis zu einem gewissen Grade die typische *Mycoides*-Form in den Randpartien behielten, aber nach dem Zentrum zu immer dichter wurden. Mikroskopisch war zu erkennen, daß von außen nach innen die einzelnen Ausläufer, die einzelnen Fäden sich immer dichter und enger zu breiten Bändern zusammenschlossen, ein Faden ohne Zwischenraum dicht am anderen, so daß schließlich die unverzweigten Partien nur noch aus dicht aneinander gelagerten Fäden bestanden, die gewellt und gebogen waren. Bei den meisten Kolonien waren auch die Randpartien nicht mehr einzelfädig. Die ganze Kolonie bestand aus den

oben beschriebenen dicht aneinander gelagerten, wellig gebogenen Fäden. Mitunter konnte man am Rande einzelne kurze Zellfäden in den Agar hinausgehen sehen. Die Oberfläche dieser Kolonien war rauh und matt, genau wie bei den typischen *Mycoides*-Kolonien das Zentrum. Ältere, etwa 20 Tage alte Kolonien, zeigten am Rande längere einzelne Ausläufer von Zellfäden, die ebenso verzweigt waren und Schleifen bildeten wie der typische *Mycoides*. In $MgSO_4$-Nährlösung, in der die *Mycoides*-Stäbchen Blasenbildung zeigen sollten, zeigt auch diese Form Blasenbildung. Aus den vielen Übergängen von der Rauhform zur Glattform, die im Laufe der Untersuchungen zu sehen waren, und die immer wieder das gleiche Bild zeigten, kann man mit Sicherheit schließen, daß es sich hier um die Glattform des *Bac. mycoides* handelt.

Am Hafelekar zeigten sich die Übergänge besonders schön. Reine, typische Rauhformen traten in bedeutend geringerer Zahl auf und bei den einzelnen Standorten auch nicht gleichmäßig, so bei Standort I bei der zweiten und dritten Probe nicht, bei Standort II bei der ersten und fünften Probe nicht, bei Standort III nicht bei der vierten Probe. Am Südhang war die typische Rauhform noch seltener, dafür aber waren mehr Übergänge zu finden, bei Standort IV war in der ersten Probe, bei Standort V in der zweiten, dritten, vierten, fünften, sechsten Probe, bei Standort VI in der dritten und sechsten Probe keine Rauhform.

Am Patscherkofel fehlte die Rauhform am Nordhang ganz bei Standort I, bei Standort II trat sie nur bei der zweiten und dritten Probe auf, während sie bei Standort III nur bei der fünften Probe fehlte. Der Südhang hatte in den meisten Proben mehr Rauhformen als Glattformen. In den Tabellen ist bei den Endzahlen *keine* Rücksicht auf Rauh- und Glattformen genommen, da ja außer den äußerlichen Kolonieunterschieden keine tiefgreifenden Unterschiede im Stoffwechsel vorhanden sein sollen. Aus welchen Gründen die Rauh- in die Glattform uberging, konnte aus diesen Untersuchungen nicht erkannt werden. Neben *Mycoides* wuchsen auf den Agarplatten sehr wenig andere Bakterien.

Das auffälligste Ergebnis dieser Untersuchungen ist der Unterschied zwischen dem Keimgehalt des *Nordhanges* und des *Südhanges*. Ein Vergleich der Abb. 4 u. 5 laßt dies gut erkennen. Dieser Unterschied muß von der Lage der Hänge, demnach von der Sonnenbestrahlung abhängen. Die Standorte des Nordhanges und des Südhanges am Hafelekar sind nur etwa 8 bis 10 m voneinander entfernt, die Unterschiede in der Vegetation und im p_H sind nicht so groß, daß damit der Unterschied im Keimgehalt erklart werden könnte. Da am Hafelekar der Keimgehalt noch niedriger ist als am Patscherkofel-Nordhang, muß die Hangneigung und die Möglichkeit der Sonnenbestrahlung eine Rolle

spielen. Der Nordhang des Hafelekar ist bedeutend stärker geneigt als der des Patscherkofels. Seine Lage ist so, daß die Sonnenstrahlen nur im spitzesten Winkel einfallen können. Am Patscherkofel ist die Neigung

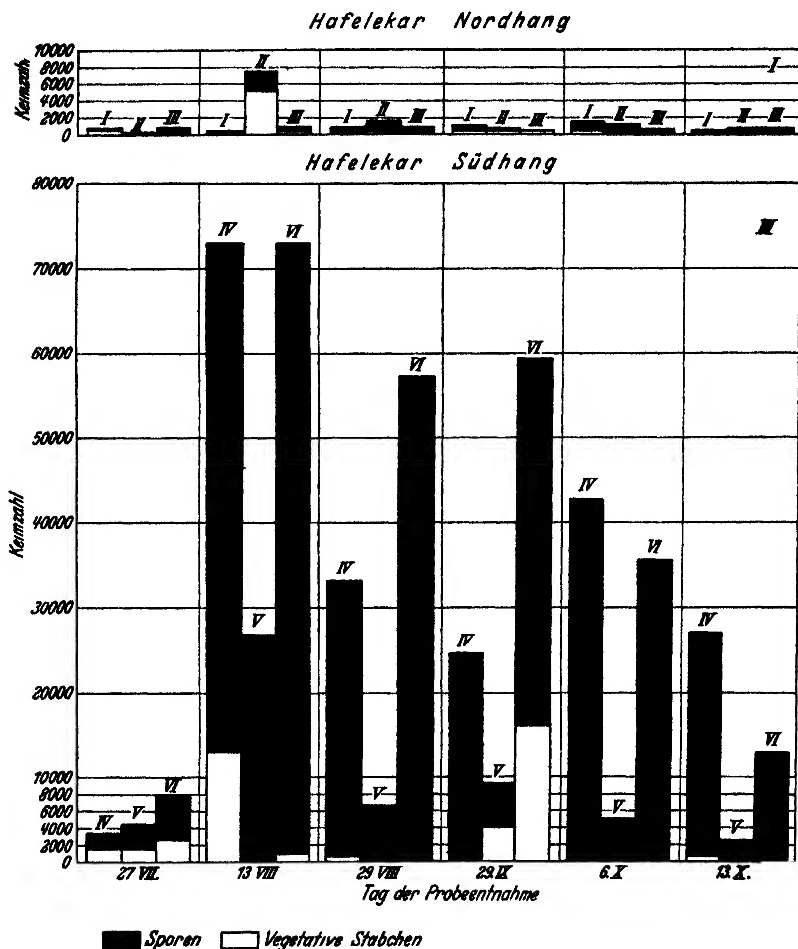


Abb 4

Der Gesamtkeimgehalt, der Gehalt an Sporen und an vegetativen Stäbchen des *Bac. mycoides* an den einzelnen Standorten des Hafelekar je 1 ccm Boden.

des Hanges lange nicht so stark und außerdem die Lage so, daß die Nachmittagssonne im großen Winkel auffallen kann. Man muß annehmen — auch *Fehér* (3) kommt zu dem Schluß —, daß die Bodenerwärmung, hervorgerufen durch die Sonnenbestrahlung, für die Tätigkeit und das Wachstum der Bodenbakterien maßgeblich ist.

Wie schon erwähnt, ist zwischen den Wasserstoffionenkonzentrationen des Bodens am Nordhang und am Südhang kein großer Unterschied. So wurde am Nordhang des Hafelekars am Standort I durchschnittlich p_H 7,4, am Standort II durchschnittlich p_H 7,3, am Standort III durchschnittlich

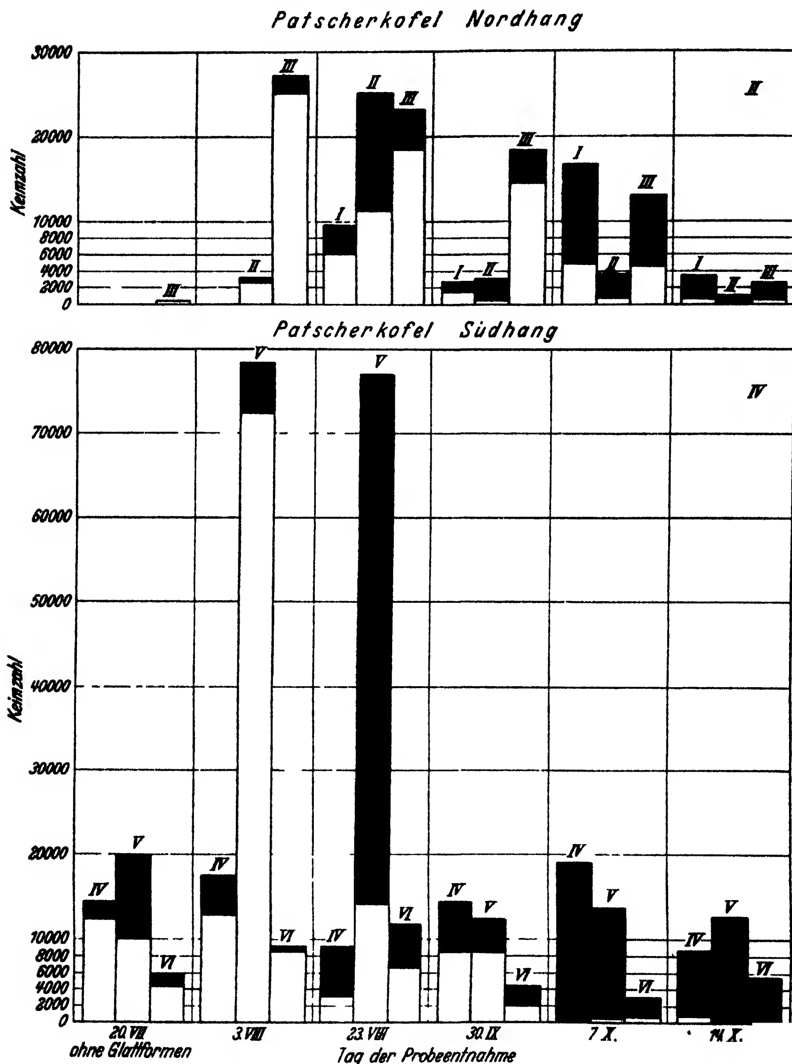


Abb. 5.

Der Gesamtkeimgehalt, der Gehalt an Sporen und an vegetativen Stäbchen des *Bac. mycoides* an den einzelnen Standorten des Patscherkofel je 1 ccm Boden.

p_H 7,4 gemessen. Die Standorte des Südhanges hatten folgende Durchschnittswerte: IV p_H 7,6, V p_H 7,8, VI p_H 7,6. Wie am Hafelekar, so hatte auch der Nordhang am Patscherkofel niedrigere p_H-Werte als der Südhang.

Nordhang: I p_H 4,0, II p_H 4,2, III p_H 4,0. Südhang: IV p_H 4,5, V p_H 4,2, VI p_H 4,3.

Die Schwankungen des p_H während des Sommers sind nicht bedeutend, wenigstens nicht so bedeutend, daß sie auf das Wachstum der Mikroorganismen Einfluß haben könnten. Die p_H-Werte schwankten am Hafelekar-Nordhang bei Standort I zwischen p_H 6,9 und 7,7, bei Standort II zwischen p_H 6,9 und 7,6, bei Standort III zwischen p_H 7,1 und 7,7; am Hafelekar-Südhang bei Standort IV zwischen p_H 7,1 und 8,0, bei Standort V zwischen p_H 7,3 und 8,2, bei Standort VI zwischen p_H 7,2 und 8,1. Am Patscherkofel waren die Schwankungen folgende: Standort I p_H 3,6 bis 4,3, Standort II p_H 3,7 bis 4,8, Standort III p_H 3,7 bis 4,4. Bei Standort II müssen nach der vierten Probeentnahme irgendwelche äußere Einflüsse das plötzliche starke Ansteigen der p_H-Zahl verursacht haben. Patscherkofel-Südhang: Standort IV p_H 4,1 bis 4,8, Standort V p_H 3,7 bis 4,7, Standort VI p_H 3,9 bis 4,7. Warum diese Schwankungen eintraten, ließ sich aus diesen Untersuchungen nicht erklären.

Auf das Ansteigen der Keimzahlen und auf das Verhältnis der vegetativen Bakterien zu den Sporen scheinen nach den Untersuchungen die Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration des Bodens keinen Einfluß zu haben. Ob die klimatischen Veränderungen im Laufe der Zeit auf die Tätigkeit der Bakterien einwirken, soll versucht werden nachzuweisen.

Die Witterungsverhältnisse am Patscherkofel vor dem 20. Juli, dem Tag der ersten Probeentnahme, waren folgende: Ende Juni und Anfang Juli war eine Periode wolkenloser Tage, die Sonnenstrahlung groß, also die Bodenfeuchtigkeit sehr gering. Dann setzte am 16. Juli starke Bewölkung, Nebel und Regen ein, die Temperaturen (die Temperaturangaben, die den Berichten der Bergstationen der Seilbahnen entnommen sind, gelten für morgens 7 Uhr 30 Minuten; andere Angaben standen leider nicht zur Verfügung) lagen zwischen 7 bis 10°. Bei geringer Bodenfeuchtigkeit wird das Wachstum der Bodenmikroorganismen stark eingeschränkt sein. Die Bakterien werden Sporen bilden. Bei Einsetzen feuchten, nicht ausgesprochen kalten Wetters wird die vegetative Tätigkeit der Bakterien wieder beginnen, die Zahl der Sporen abnehmen. Das Ergebnis der Proben war dann am 20. Juli auch dementsprechend. Bei diesen Proben wurden allerdings nur die Rauhformen berücksichtigt, die Zahl der *Mycoides*-Keime ist also geringer als in Wirklichkeit, doch wird das Verhältnis von Sporen zu vegetativen Formen stimmen. Die Ergebnisse sind aus den Tabellen zu ersehen.

Vom 20. Juli bis zum 3. August, dem Tage der zweiten Probeentnahme am Patscherkofel, war das Wetter zunächst noch neblig, regnerisch bis zum 24. Juli, dann war es leicht bewölkt bis zum 3. August. Der Boden war etwas feucht; infolge der leichten, wechselnden Bewölkung konnte zeitweise Erwärmung des Bodens durch Sonnenstrahlung eintreten, ohne daß er ganz austrocknete. Die Temperaturen lagen vom 30. Juli bis 2. August zwischen 9 und 14°. Die Bakterien werden günstige Vegetationsbedingungen gehabt haben, infolgedessen traten die Sporen im Verhältnis zu den vegetativen Formen sehr zurück.

Zwischen dem 3. und dem 23. August war es bis zum 6. August neblig und regnerisch, dann nahezu wolkenlos bis zum 22. August. Am 22. August

gab es einen starken Gewitterregen. Die Temperaturen lagen zwischen 12 und 16°. Die Bakterien dürften während der langen Trockenzeit mit starker Sonnenstrahlung vollkommen sporuliert gewesen, durch den Gewitterregen aber zu neuer Tätigkeit angeregt worden sein. Die vegetativen Formen überwogen noch nicht an allen Standorten die sporulierenden.

Vom 23. August bis 27. September war eine Trockenperiode. Nur an 3 Tagen war es neblig. Vom 27. bis 30. September regnete es. Die Temperaturen waren schon niedriger: 7 bis 9°. Die Verhältnisse dürften die gleichen wie in der vorhergehenden Zeit zwischen den Probeentnahmen gewesen sein: Vollkommene Sporulation der Bakterien, durch den kurz vor der Probeentnahme einsetzenden Regen wieder Überwiegen der Vegetativen.

Vom 30. September bis 7. Oktober war es bewölkt, am 4. Oktober fiel Schnee. Bei der Probeentnahme am 7. Oktober waren die Standorte schon wieder schneefrei. Die Temperaturen waren um 0°. Die Sporen überwogen weitaus.

Am 8. Oktober fiel Schnee, ebenso am 10. Oktober. Am 14. Oktober waren die Standorte alle unter Schnee. Fast nur Sporen waren zu finden. Die Sporen am 7. Oktober schienen teilweise noch ausgekeimt, die Keimlinge aber durch den plötzlichen Schneefall am 8. Oktober zugrunde gegangen zu sein, da die Keimzahlen am 14. Oktober durchwegs niedriger waren als am 7. Oktober.

So wie sich auf dem Patscherkofel die Verhältnisse der Keimzahlen erklären, lassen sie sich auch am Hafelekar verstehen.

Nach einer Witterungsperiode, die für die Bakterien günstig war, gab es Ende Juni plötzlichen Wettersturz mit Schneefall, dabei müssen die meisten Vegetativen zugrunde gegangen sein, sonst kann man sich die geringe Zahl am Südhang nicht erklären. Im ganzen Juli war es am Hafelekar neblig, bewölkt und ziemlich kalt, durchschnittlich 3°. Eine besonders reiche Tätigkeit werden die Bakterien nicht haben entfalten können, daher die immer noch schwache Anzahl am Tag der Probeentnahme, dem 27. Juli.

In der Zeit vom 27. Juli bis 13. August fiel am 3. und 5. August Schnee. Die Temperaturen waren um 0°. Dann wurde es wärmer am 7. August und wolkenlos am 8. August. Temperaturen um 10°. Die Bakterien wuchsen in dem vom Schmelzwasser feuchten und von der starken Sonnenstrahlung erwärmten Boden sehr stark. Da der Boden aber infolge der intensiven Sonnenstrahlung schnell wieder austrocknete, sporulierten sie bald. Der 13. August war schon der 6. Tag intensivster Sonnenstrahlung.

Vom 13. bis 29. August war eine Trockenperiode. Die Proben enthielten am 29. August fast nur Sporen; auch der Gesamtkeimgehalt war zurückgegangen.

Die Zeit vom 29. August bis 29. September war anfangs trocken, dann um den 13. September regnerisch und anschließend bis 22. September sehr trocken, dann bis 29. September neblig ohne besondere Niederschläge. Das Wachstum wird nach dem Regen um den 13. September eine Belebung erfahren haben, dann werden wieder Sporen entstanden sein und schließlich durch den Nebel, der etwas den Boden angefeuchtet haben wird, sich eine schwache Keimung vollzogen haben. Da vom 22. August ab die Temperaturen sehr niedrig waren, um 5°, wird die Keimung jedenfalls sehr schwach gewesen sein.

Vom 29. September bis zum 13. Oktober fiel sehr viel Schnee, die Standorte waren fast dauernd mit Schnee bedeckt. Die Temperaturen waren demgemäß sehr niedrig. Es wurden fast nur Sporen gefunden.

Aus diesen Ergebnissen kann man wohl den Schluß ziehen, daß die Tätigkeit des *Bac. mycoides* im wesentlichen von den klimatischen Verhältnissen, besonders von der Bodentemperatur und dem Wassergehalt des Bodens abhängig ist, wie es durch *Fehér* (3) bezüglich des Mikrobenlebens des Waldbodens festgestellt wurde.

Die Schwankungen der Gesamtkeimzahlen — Sporulierende und Vegetative — an einem und demselben Standort sind ziemlich stark: So wurden an manchen Standorten, z. B. Hafelekar II, Schwankungen zwischen 200 bis 7500 Keimen, bei IV zwischen 3400 und 73000 Keimen, ebenso auf dem Patscherkofel bei II zwischen 1000 und 25800, bei III zwischen 2200 und 27600, bei V zwischen 12400 und 78200 Keimen festgestellt.

Ein Blick auf die Tabellen 1 bis 4 zeigt offenkundig ein allgemeines Ansteigen der Gesamtkeimzahl in der Hauptvegetationsperiode der alpinen Region und ein allgemeines Sinken gegen den Herbst. Daraus ist, selbst bei Beachtung unkontrollierbarer Begleitumstände, zu schließen, daß viele Individuen mit der Verschlechterung der Außenbedingungen *vor* der Sporulation zugrunde gehen oder lebensunfähige Sporen erzeugen.

Die Feststellungen im ersten Teil der Arbeit uber die Verbreitung des *Bac. mycoides* dürften im großen und ganzen durch diese Ergebnisse nicht erschüttert werden, da sie ziemlich eindeutig sind, wohl aber lassen sich manche Unstimmigkeiten im Verlaufe der betreffenden Kurven auf die Ungleichheit der Bedingungen zurückführen, die zur Zeit der Probeentnahme an den mannigfaltigen Standorten herrschten.

8. Untersuchungen über das Wachstum von Stämmen verschiedener Standorte.

Im ersten Abschnitt über die Verbreitung des *Bac. mycoides* ergab sich, daß die Wasserstoffionenkonzentration eines beweideten Bodens keine Rolle fur die Verbreitung des *Mycoides* spielt. Nun sollte untersucht werden, ob sich Wachstumsunterschiede nachweisen lassen zwischen Stämmen von Dungböden und von dungfreien Böden, die sich außerdem durch entgegengesetzte extreme p_H-Werte unterscheiden. Bei dieser Gelegenheit sollte auch untersucht werden, ob bei diesen *Mycoides*-Stämmen verschiedene Stickstoffquellen bei bestimmtem p_H der Nährlösung für den Aufbau der Körpersubstanz verschieden ausgenutzt werden. Leider mußte zunächst die Zahl der zu untersuchenden Stickstoffquellen sehr beschränkt werden, obgleich es beim *Mycoides* von großer Wichtigkeit wäre festzustellen, welche Stickstoffquellen

er als typischer Stickstoffumsetzer besonders bevorzugt. Es wurde bei diesen Untersuchungen weniger Wert darauf gelegt zu erfahren, wie die chemischen Leistungen der Stämme variieren, sondern festzustellen, ob ein Stamm von saurem Standort (mit durch Düngung für ihn günstigen Lebensumständen) geringeres Wachstum zeigt, wenn man ihn in ein alkalisches Nährmedium bringt und umgekehrt. Zur Ermittelung der Wachstumsintensität erwies sich am geeignetsten die gewichtsmäßige Bestimmung der Trockensubstanz der in den Nährflüssigkeiten gewachsenen Bakterien. Aus dem Stickstoffgehalt der Trockensubstanz kann man unter der Annahme, daß die stoffliche Zusammensetzung der Bakterienzelle, besonders des Eiweißes als stickstoffhaltiger lebenswichtiger Substanz, von der Ernährung abhängig ist, auf ihren „Ernährungszustand" schließen.

Es kommt also im wesentlichen bei vorliegenden Untersuchungen darauf an festzustellen, wie sich die einzelnen Stämme von verschiedenem Standort im bestimmten Nährmedium bei bestimmter Wasserstoffionenkonzentration im Wachstum, festgelegt durch die Bestimmung der Bakterientrockensubstanz und ihres Stickstoffgehaltes, verhalten. Zur quantitativen Bestimmung der Bakterientrockensubstanz wurde ein von mir ausgearbeitetes Filtrationsverfahren (11) benutzt.

Die Stickstoffbestimmungen geschahen nach *Kjeldahl* in einem Mikroapparat. Als Vorlage diente n/70 HCl; zurücktitriert wurde mit n/70 NaOH mit Methylrot als Indikator. Durch den Apparat wurde während der Destillation ein Luftstrom gesogen. Um zu verhindern, daß mit dieser Luft in irgendeiner Form bestimmbarer N in die Analyse gelangt, wurde, was am Apparat nicht vorgesehen war, eine Waschflasche mit H_2SO_4 vorgeschaltet.

Meinen Versuchen sollte eine konstante mineralische Nährlösung zugrunde gelegt werden, in der nur immer die Stickstoffquelle und das p_H eine Änderung erfahren sollten.

In synthetischen Nährlösungen mit Asparagin, wie denen von *Fränkel*, *Maassen*, *Proskauer* und *Beck*, *Robinson* und *Tartar*, *Glinka-Tschernorutzky*, wuchs *Bac. mycoides* entweder gar nicht oder nur sehr schlecht, wie folgende Beispiele zeigen:

Nährlösung nach *Fränkel* ohne besonderen Zusatz oder mit Zusatz einer Kohlenstoffquelle: nach 7 Tagen nur minimales Wachstum.

Nährlösung nach *Robinson* und *Tartar* und 1% Asparagin: nach 12 Tagen nur sehr mäßiges Wachstum.

Nährlösung nach *Maassen* und 1% Glucose: nach 20 Tagen gutes Wachstum. Das Wachstum trat so plötzlich ein, daß man an eine Verunreinigung denken konnte, was aber, wie die Untersuchung ergab, nicht der Fall war.

Nährlösung nach *Proskauer* und *Beck*: nach 16 Tagen schwaches Wachstum.

Nährlösung nach *Glinka-Tschernorutzky*, statt Pepton 1% Asparagin: nach 10 Tagen mittelmäßiges Wachstum.

Ich entschied mich für die Nährlösung von *Glinka-Tschernorutzky* (12), da die Ausfällung, die bei allen Nährlösungen beim ersten Sterilisieren eintritt, hier verhältnismäßig gering ist, mithin die ursprüngliche Zusammensetzung der Nährlösung am wenigsten geändert wird.

Die Beimpfung der Kulturkolben geschah folgendermaßen: Von einer 24 Stunden alten Schrägagarkultur wurden zwei Ösen in 5 ccm 0,85 %iger NaCl-Lösung gebracht, diese wurde nach gründlichem Schütteln durch sterile Watte filtriert, um größere Flocken zurückzuhalten; vom Filtrat wurden dann mit steriler Pipette in jeden Kolben 0,5 ccm übertragen. Nach der Beimpfung und dann in Abständen von 24 Stunden wurden die Kulturen zwecks Anreicherung mit Sauerstoff umgeschüttelt. Die Kolben wurden bei 28° 70 Stunden lang aufbewahrt. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde ein hängender Tropfen auf Sporen untersucht. Gleichzeitig wurde jede Kultur auf Reinheit und auf etwa vorhandene Koagulate und Ausfällungen geprüft.

Die p_H-Bestimmungen wurden mit der Indikatorenmethode unter Zuhilfenahme des Komparators nach *Michaelis* ausgeführt.

Zur Untersuchung wurden Stämme herangezogen, die aus den Bodenproben mit extremen p_H-Werten stammten: Stämme *A* aus Bodenprobe Nr. 214 (beweideter *Fichten-Lärchen*-Mischwald, *Rhododendron ferrugineum*, *Vaccinium*, 1640 m, p_H 5,7, Urgestein. Häufigkeitsgrad 25) und Stämme *E* aus Bodenprobe Nr. 16 (Felsspalte, spärlich mit *Moos* bewachsen, 1670 m, p_H 8,0, Kalk, Häufigkeitsgrad 2).

Um die Stämme zu isolieren und die Nichtsporenbildner abzutöten, wurde die Aufschwemmung der Böden zunächst etwa 10 Minuten lang bis 70° erwärmt. Hierbei zeigte sich, daß gerade in diesen beiden Bodenaufschwemmungen nach dieser Vorbehandlung eine Entwicklung des *Bac. mycoides* nicht mehr eintrat, im Gegensatz zu drei anderen Bodenproben, die ein p_H von 6,4, 7,1, 7,5 aufwiesen. Dieser Befund läßt vermuten, daß *Bac. mycoides* unter den ortlichen Bedingungen nicht sporuliert hatte. Die Kulturen mußten also aus nicht erhitzten Bodenaufschwemmungen isoliert werden.

Da, wie im zweiten Teil der Untersuchungen festgestellt wurde, das p_H der Standorte nur wenig schwankt, wurden, um jede Beeinflussung der Stämme durch Änderung des p_H-Wertes des Nährbodens zu vermeiden, die Stämme auf einem Nährboden weitergezüchtet, der der Wasserstoffionenkonzentration entsprach, die der Standort am Tage der Probeentnahme hatte.

An den einige Zeit nach Isolierung der Reinkulturen zur Kontrolle der Reinheit gegossenen Platten fiel auf, daß alle Stämme „Rauhformen" und Übergänge zur „Glattform" aufwiesen, obwohl sie ursprünglich von Kolonien abgeimpft waren, die die typische „Rauhform" des *Bac. mycoides* darstellten. Bei allen Stämmen wurde die absolute Reinheit mehrfach unter dem Mikroskop und durch Plattenguß geprüft.

Versuchsergebnisse.

Die Grundnährlösung war die von *Glinka-Tschernorutzky* (12). Die Zusammensetzung ist auf 1000 ccm H_2O folgende: Pepton *Witte* 10,0 g, $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,5 g, NaCl 0,1 g, K_2HPO_4 1,0 g, $FeSO_4$ 0,02 g, $CaCl_2$ 0,1 g.

Als Stickstoffquellen wurden benutzt: Pepton als die allgemein für Nährflüssigkeiten übliche Stickstoffquelle, Hefeextrakt als eine rein pflanz-

liche Stickstoffquelle und Huminsäure[1], die im Boden eine große Rolle spielt. Einmal mußten Pepton und Huminsäure gleichzeitig auch als Kohlenstoffquelle dienen, und zum anderen Male wurde Glycerin als Kohlenstoffquelle hinzugefügt. Hefeextrakt wurde einfach zu 1 % in H_2O gelöst.

Als Ausgangs-p_H der zu beimpfenden Nährlösung wurden p_H 8,0, p_H 7,3, p_H 6,0 angewendet, p_H 8,0 als Standorts-p_H der Stämme *E*, p_H 7,3 als ungefähres Optimum für *Bac. mycoides* und p_H 6,0 als Standorts-p_H der Stämme *A*.

Versuchsbeispiel.

Nährlösung: *Glinka-Tschernorutzky* mit 1 % Pepton, p_H 7,3; N- und C-Quelle: Pepton; Stickstoffgehalt der Nährlösung: 7,16 mg in 50 ccm; Kulturdauer: 70 Stunden.

Wachstum: Nach 24 Stunden hat der Stamm E_{II} einen flockigen, in sich zusammenhängenden Bodensatz gebildet, der sich beim Umschütteln kaum auflöst. Die Flüssigkeit selbst ist vollkommen klar. Die Flocken erinnern in ihrer Struktur an die Kolonien auf Agar. Der Stamm A_{II} ist schwächer gewachsen. Die gesamte Flüssigkeit ist leicht getrübt.

Nach 70 Stunden ist der Befund ungefähr der gleiche. Stamm E_{II} hat die Flüssigkeit auch etwas getrübt.

Mikroskopischer Befund: E_{II} zeigt beginnende Sporulation, meist lange Ketten von Individuen. A_{II} zeigt Sporen in ganz kurzen Ketten von drei bis vier Individuen.

Kultur:	$E_{II}1$	$E_{II}2$	$A_{II}1$	$A_{II}2$
p_H nach Beendigung des Versuchs .	7,3	7,5	7,4	7,4
Trockengewicht in mg	31,2	34,9	15,0	14,2
N-Gehalt der Trockensubstanz in mg	2,92	3,47	1,63	1,34
$\frac{\text{mg N}}{\text{mg Bakterien}}$	0,094	0,097	0,108	0,095

Das hervorstechendste Ergebnis der Untersuchungen ist, daß eine Einwirkung der Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens auf die Entwicklung der isolierten Stämme in dem Sinne, daß Stamm *A* bei p_H 6,0 besser wuchse als Stamm *E* und umgekehrt Stamm *E* bei p_H 8,0 besser als Stamm *A*, *im allgemeinen nicht beobachtet werden konnte.* Nur in einem Falle (Versuch 15) bei Verwendung von Hefeextrakt als N-Quelle wurden bei einem p_H 6,0 von Stamm A_{II} 55 mg, von Stamm E_{II} nur 6,7 mg Bakterientrockensubstanz geerntet.

Wurde Pepton als Stickstoffquelle gegeben, so war bei p_H 8,0 (Versuch 2) das Wachstum beider Stämme gleich: 18,6 mg Trockensubstanz im Mittel. Bei den Wasserstoffionenkonzentrationen von p_H 7,3 und 6,0 (Versuch 1 und 5) zeigte Stamm *A* aber ein bedeutend geringeres Wachstum als Stamm *E*. A_{II} 5,3 mg, E_{II} 33,0 mg bzw. A_{II} 7,0 mg, E_{II} 13,7 mg. Dieses

[1] Die Zusammensetzung der Huminsäure scheint auch als Präparat zu schwanken, da ich bei verschiedenen Sendungen verschiedene N-Gehalte fand.

Tabelle I.

Nährlösung N-Quelle / C-Quelle	1 % Pepton									
p_H bei Beimpfung:	7,3		8,0		6,0				7,3	
Stamm	E_{II}	A_{II}	E_{II}	A_{II}	E_{II^1}	E_{II^2}	A_{II^1}	A_{II^2}	E_{IV}	A_{I}
Dauer der Kultur in Std.	70	70	70	70	70	140	70	140	70	70
p_H nach Beendigung der Kultur	7,4	7,4	7,7	7,7	6,3	6,5	6,1	6,1	7,3	7,3
Trockensubstanz in mg	33,0	14,6	18,5	18,7	13,7	48,0	4,7	7,0	25,9	7,2
N-Gehalt der Trockensubstanz in mg	3,19	1,48	1,49	1,43	0,76	5,99	0,28	0,25	1,90	0,65
mg N / mg Bakterien	0,096	0,101	0,079	0,076	0,044	0.124	0,059	0,036	0,073	0,091
Mikroskopischer Befund	±	±	—	—	—	±	Hungerformen		—	—
Nr. des Versuchs	1	1	2	2	3	3	3	3	16	16

+ Sporen, — ohne Sporen, ± sporulierend

Tabelle II.

Nährlösung N-Quelle / C-Quelle	0,1 % Huminsäure									
p_H bei Beimpfung.	7,3				8,0		6,0			
Stamm	E_{II^1}	E_{II^2}	A_{II^1}	A_{II^2}	E_{II}	A_{II}	E_{II^1}	E_{II^2}	A_{II^1}	A_{II^2}
Dauer der Kultur in Std.	70	140	70	140	70	70	70	140	70	140
p_H nach Beendigung der Kultur	7,3	—	7,2	7,2	7,8	7,8	6,0	6,0	6,0	6,0
Trockensubstanz in mg	7,4	—	4,4	7,2	5,7	5,4	5,4	7,0	4,6	6,6
N-Gehalt der Trockensubstanz in mg	0,32	—	—	0,34	0,25	0,21	—	—	—	—
mg N / mg Bakterien	0,044	—	—	0,046	0,043	0,038	—	—	—	—
Mikroskopischer Befund	Hungerformen	(verunreinigt)	Hungerformen		teratologische Formen		Hungerformen			
Nr. des Versuchs	4	4	4	4	5	5	6	6	6	6

Tabelle III.

Nährlosung { N-Quelle / C-Quelle	1 % Hefeextrakt					
p_H bei Beimpfung	7,3		8,0		6,0	
Stamm:	E_{II}	A_{II}	E_{II}	A_{II}	E_{II}	A_{II}
Dauer der Kultur in Std.	70	70	70	70	70	70
p_H nach Beendigung der Kultur	7,0	7,1	7.4	7,5	6,0	6,2
Trockensubstanz in mg	54,0	80,5	45,5	47,7	6,7	55,0
N-Gehalt der Trockensubstanz in mg	5,65	8,32	4.52	4,85	0,24	5,42
$\frac{\text{mg N}}{\text{mg Bakterien}}$	0,104	0.103	0,099	0,099	0,036	0,099
Mikroskopischer Befund	±	±	±	±	Hungerform	±
Nr. des Versuchs	13	13	14	14	15	15

\+ Sporen, — ohne Sporen, ± sporulierend.

Tabelle IV.

Nährlosung { N-Quelle / C-Quelle	2 % Glycerin + 1 % Pepton							
p_H bei Beimpfung	7,3		8,0		6,0		7,3	
Stamm:	E_{II}	A_{II}	E_{II}	A_{II}	E_{II}	A_{II}	E_{IV}	A_{I}
Dauer der Kultur in Std.	70	70	70	70	264	264	70	70
p_H nach Beendigung der Kultur	7,4	7,4	7,7	7,7	6,0	6,0	7,5	7,4
Trockensubstanz in mg	27,9	55,9	18,1	26,7	kein Wachstum		25,5	44,5
N-Gehalt der Trockensubstanz in mg	2,56	6,51	1,24	2,08			1,98	3,79
$\frac{\text{mg N}}{\text{mg Bakterien}}$	0,092	0,116	0,069	0,078			0,078	0,086
Mikroskopischer Befund	±	±	—	—			—	—
Nr. des Versuchs	7	7	8	8	9	9	17	17

Tabelle V.

Nährlösung { N-Quelle / C-Quelle	2 % Glycerin + 0,1 % Huminsäure					
p_H bei Beimpfung:	7,3		8,0		6,0	
Stamm:	E_{II}	A_{II}	E_{II}	A_{II}	E_{II}	A_{II}
Dauer der Kultur in Std.	140	140	140	140	140	140
p_H nach Beendigung der Kultur	7,0	7,2	7,9	7,9	6,0	6,0
Trockensubstanz in mg	11,8	6,7	4,9	8,2	kein Wachstum	
N-Gehalt der Trockensubstanz in mg mg N	0,81	0,47	0,35	0,45		
mg Bakterien	0,069	0,072	0,072	0,072		
Mikroskopischer Befund	+	+	+	+		
Nr. des Versuchs	10	10	11	11	12	12

+ Sporen, — ohne Sporen, ± sporulierend.

Verhältnis kehrte sich aber bei einem p_H 7,3 (Versuch 7) nach Zusatz von Glycerin um, A_{II} 52 mg, E_{II} 27,9 mg Trockensubstanz. In Pepton und Glycerin p_H 6,0 (Versuch 9) trat überhaupt kein Wachstum ein, auch nicht nach 140 Stunden und nach nochmaligem Beimpfen nach Ablauf dieser Zeit. Da in diesen Kulturen auch mikroskopisch nicht die geringste Entwicklung zu bemerken und die Reaktion der Nährlösung unverändert geblieben war, muß man annehmen, daß die Sporen überhaupt nicht gekeimt hatten. Glycerin muß also bei einer hohen Wasserstoffionenkonzentration hemmend auf die Sporenkeimung wirken. Dasselbe Bild zeigte sich auch bei Huminsäure und Glycerin p_H 6,0 (Versuch 12).

In Hefeextraktlösung wuchs auch Stamm *A* durchweg besser als Stamm *E*: (Versuch 13) A_{II} 80,5 mg, E_{II} 54,0 mg, (Versuch 14) A_{II} 47,7 mg, E_{II} 45,5 mg, (Versuch 15) A_{II} 55,0 mg, E_{II} 6,7 mg. Mit Huminsäure waren die Ergebnisse nicht so, wie sie nach den Vorversuchen zu erwarten gewesen wären. Bei einem Vorversuch mit Huminsäure (zu der mineralischen Grundlösung nach *Glinka-Tschernorutzky* wurden 0,1- bzw. 1 %ige Huminsäure gegeben) trat nach 24 Stunden ein sehr gutes, flockiges Wachstum ein, und zwar bei 0,1 %iger Huminsäure bedeutend mehr als bei 1 %. Diese Nährlösung war aber nicht durch Membranfilter filtriert worden, sondern

nur durch gehärtete Papierfilter. Bei den Hauptversuchen mußte durch Membranfilter mit der Porenweite 0,4 μ filtriert werden; diese Filtration hat anscheinend Änderungen in der Beschaffenheit der Nährlösung im Gefolge, die das Wachstum ungünstig beeinflussen. Ein normales Wachstum fand nur kurze Zeit statt, dann gab es Sporen oder anormale Formen. Das waren etwas deformierte, leicht gekrümmte Stäbchen, also Hungerformen oder teratologische Formen, Riesenstäbchen und fast blasenförmige Gebilde mit gekörntem Inhalt. Der Zusatz von Glycerin zur Huminsäure wirkte sich bei p_H 7,3 und 8,0 (Versuch 10 und 11) günstig aus. Es gab normales Wachstum. Stamm E_{II} wuchs bei p_H 7,3 besser als A_{II}: E_{II} 11,8 mg, A_{II} 6,7 mg, und bei p_H 8,0 war es umgekehrt: E_{II} 4,9 mg, A_{II} 6,2 mg. Bei p_H 6,0 zeigte sich, wie schon erwähnt, kein Wachstum.

Nach den Ergebnissen unterscheiden sich die isolierten Stämme weniger durch ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen als durch das Ausnutzungsvermögen der Stickstoff- und Kohlenstoffquellen. In einem allgemein gut zusagenden Nährmedium wie Hefeextrakt und mineralischer Grundlösung und Pepton mit Glycerin wächst der Stamm A_{II} unabhängig vom p_H bedeutend besser als E_{II}, während bei mineralischer Grundlösung und Pepton oder Huminsäure, also in Nährmedien, die dem *Bac. mycoides* weniger zusagen, Stamm E_{II} das bessere Wachstum aufweist. Man könnte diese Beobachtungen dahin deuten, daß *A_{II} in seiner Ernährung auf günstigere Bedingungen eingestellt ist als Stamm E_{II}.*

Der Quotient mg N/mg Bakt. ist bei Pepton und Pepton und Glycerin, wie aus der Tabelle zu ersehen ist, *nicht* einheitlich. Bei Hefeextrakt und Huminsäure mit Glycerin dagegen ist der Quotient unabhängig vom p_H bei jeder Kulturflüssigkeit gleich. Es scheint demnach eine gewisse Abhängigkeit zwischen Nährmedium und N-Gehalt der Bakterienmasse oder ihrem Ernährungszustand zu bestehen. Andererseits scheint aber auch das Entwicklungsstadium der Kultur für den Quotienten von Bedeutung zu sein, denn in den Fällen, wo die Kulturen gerade bei der Sporulation waren (Versuch 1, 3, 7, 13, 14), waren die Quotienten am größten, etwa 0,10, während der Quotient in noch nicht sporulierenden Kulturen um 0,078 herum lag. In den Fällen, wo nur Hungerformen auftraten, ist der Quotient fast gleich, etwa 0,043 (Versuch 3, 4, 5). Die Unterschiede der Quotienten könnten vielleicht so erklärt werden, daß in einer gerade sporulierenden Kultur die Bakterienzelle zur Bildung einer Spore viel Eiweiß angesammelt haben muß, mehr jedenfalls, als wenn sie ihren normalen Stoffwechsel fortsetzen würde. In Hungerformen wurde, wie zu erwarten war, der geringste Stickstoffgehalt gefunden.

Die Veränderungen der p_H-Zahl des Nährmediums durch das Wachstum waren nicht so groß, wie man nach den Ergebnissen von *Glinka-Tschernorutzky* erwarten konnte. Allgemein trat ein Rückgang des p_H bei einer anfänglichen Wasserstoffionenkonzentration von p_H 8,0 ein, und zwar

war er am stärksten bei Hefeextrakt, wo die p_H-Zahl bis auf 7,5 bzw. 7,4 herunterging (Versuch 14). Bei p_H 7,3 ging das p_H teils sogar hinauf (Versuch 1, 7, 17) und nur bei Hefe und Huminsäure mit Glycerin (Versuch 10 und 13) herunter, bei p_H 6,0 ging es allgemein hinauf mit Ausnahme der Kulturen, in denen anormale Formen auftraten oder das Wachstum ganz unterblieb. Alle diese Änderungen sind jedoch nicht unbedingt zuverlässig, da durch das Umschütteln der Kulturen ein Teil des eventuell gebildeten Ammoniaks aus der Flüssigkeit ausgetrieben und dadurch das p_H ungleichmäßig verändert wurde.

Sporen wurden bei Huminsäure mit Glycerin (p_H 7,3 und 8,0, Versuch 10 und 11) gefunden und beginnende Sporulation in Pepton (p_H 7,3, Versuch 1), bei Stamm E_{II} (p_H 6,0) nach 140 Stunden (Versuch 3) in Pepton mit Glycerin (Versuch 7) und in Hefeextrakt (Versuch 13, 14, 15). Hungerformen zeigte Stamm A_{II} bei Pepton (p_H 6,0, Versuch 3), bei Huminsäure (p_H 7,3 und 6,0, Versuch 4 und 6), Stamm E_{II} bei Hefeextrakt (p_H 6,0, Versuch 15). Es waren kleine, verkümmerte, in ihrer Form unregelmäßige Stäbchen, mitunter wohl auch leere Membranen. Die teratologischen Formen, die bei Huminsäure (p_H 8,0) auftraten, bestanden aus Riesenstäbchen und blasenförmigen Gebilden, deren gekörnter Inhalt Molekularbewegung und teilweise ein Flimmern des gekörnten Inhalts zeigte.

Bei fast allen gut wachsenden Kulturen fiel auf, daß *Bac. mycoides* anfangs bei völlig klar bleibender Flüssigkeit ausschließlich in Flocken wuchs, die sich später teilweise aufzulösen begannen und die Flüssigkeit trübten. Es waren dann viele Einzelstäbchen zu finden, die meist als Kurzstäbchen anzusprechen waren. Bisweilen waren auch in den Kulturen Hautfetzen zu finden, die in ihrer Struktur an die dicht aneinandergelagerten Ketten der „Glatt"-Form erinnerten.

Der Zweck dieser Untersuchungen war, wie schon erwähnt, festzustellen, ob die *Mycoides*-Stämme, die an Standorten mit verschiedenem p_H gefunden wurden, in ihrem Wachstum Beziehungen zu dem p_H des Standortes erkennen ließen. Das scheint nach den vorliegenden Ergebnissen *nicht* der Fall zu sein. Wohl aber konnte man *Wachstumsunterschiede der beiden Stämme* erkennen, und zwar in der Hinsicht, daß *der aus gedüngtem Boden stammende Stamm besser die N- und C-Quellen ausnutzen kann als der aus ungedüngtem Boden.*

Die nachträglich aus den gleichen Bodenproben Nr. 214 und Nr. 16 isolierten Stämme A_I und E_{IV} zeigten in den Nährlösungen Pepton und Pepton mit Glycerin (Versuch 16, 17) das gleiche Verhalten wie die Stämme A_{II} und E_{II}. Zur Entscheidung der Frage, ob die beobachteten Unterschiede als konstante Stammes- oder vorübergehende Standortseigentümlichkeiten zu deuten sind, genügen die Versuche allerdings nicht.

Die Tatsache, daß es *Mycoides*-Stämme gibt, die N-Quellen verschieden ausnutzen — was durch weitere Versuche bei Ausdehnung auf andere Quellen noch klarer zu erhärten wäre —, ließ die Frage aufkommen, ob nicht etwa der Umsetzer N-haltiger organischer Substanz und NH_3-Bildner *Mycoides* unter Umständen auch *anorganische* N-

Quellen verarbeiten kann. Zur Klärung dieser Frage wurden Versuche mit der Nährlösung nach *Glinka-Tschernorutzky* ausgeführt, in der Pepton durch *Ammoniumsalze* ersetzt und 2% Glycerin als C-Quelle hinzugegeben wurde.

Mit NH_4NO_3 als N-Quelle war nach 3 Tagen Wachstum eingetreten. Es wurden Kulturen von fünf *verschiedenen* Stämmen angelegt, die sich alle gleich verhielten. Die Nährlösung hatte wie alle dieser Versuchsreihe ein $p_H = 7{,}3$. Alle Kulturen hatten einen flockigen Bodensatz. Der mikroskopische Befund zeigte nach 8 Tagen Sporen und teilweise Involutionsformen.

Auch mit $(NH_4)_2SO_4$ als N-Quelle trat bei allen Stammen Wachstum ein. Nach 14 Tagen waren die Kulturen stark mit Flocken durchsetzt. Mikroskopisch zeigten sich viele kleine Ketten von zwei bis vier Individuen, daneben Gewirre von Fäden zu Flocken vereinigt. Sporen waren in keiner Kultur zu finden. Bei Stamm *C*, bei *Citreus* und bei der *Glattform* schien leichte Eigenbewegung vorhanden zu sein. Auch hier wurden alle Kulturen wie beim vorhergehenden Versuch durch Plattenguß auf Reinheit nachgeprüft und erwiesen sich als rein. *Citreus* wuchs wieder gelb, obwohl er auf Agar öfter in einigen Teilen der Kolonie in die gewöhnliche farblose Form umschlug. Bei A_I und *C* zeigte sich eine starke Neigung, die Glattform zu bilden.

In der Nährlösung mit $CaNO_3$ als N-Quelle trat nach 20tägiger Kultur noch immer kein Wachstum ein Es scheint also nur der Ammoniakstickstoff verarbeitet zu werden.

Zur einwandfreien Verwertung dieser Ergebnisse mußte eine nähere Untersuchung der Stoffwechselvorgänge durchgeführt werden. Jedenfalls ist aber bei *Mycoides* eine Eiweißsynthese aus anorganischen N-Salzen bei Anwesenheit einer bestimmten organischen C-Quelle durchaus möglich, und es wäre sehr interessant, den N-Gehalt so gewachsener Bakterienleiber festzustellen Leider war es mir im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, entsprechende Untersuchungen auszuführen. Es müssen jedenfalls eigenartige Zusammenhänge sein, da Asparagin unter den gleichen Bedingungen bedeutend schwächer verarbeitet wurde. Die Tatsache, daß Ammoniak, Asparagin und Pepton dem *Mycoides* als N-Quelle dienen können, und daß Ammoniak wiederum als sein bekanntestes Endprodukt des Stickstoff-Stoffwechsels gilt, läßt Beziehungen zum N-Stoffwechsel der grünen Pflanzen zu. Hier ist NH_3 über Aminosäuren Baustoff des Eiweißes, es kann Eiweiß wieder über Aminosäure zu NH_3 abgebaut werden. Durch die Feststellung, daß *Mycoides* N aus NH_3-Salzen aufnimmt und zum Körperaufbau benutzt, ist es in dem Bereich der Möglichkeit gerückt, daß der N-Stoffwechsel auch hier ähnlich dem der grünen Pflanze vonstatten geht. Vielleicht kann man auch bei den Bakterien auf

Grund der physiologischen Fähigkeit des *Mycoides* noch einmal feststellen, daß das NH_3 das Alpha und Omega im N-Stoffwechsel ist. Sehr bemerkenswert ist auch, daß mit $(NH_4)_2SO_4$ als N-Quelle nach 14 Tagen immer noch keine Sporen gebildet waren, während auf Agar schon nach 3 Tagen und öfter noch früher Sporulation eintrat. Da es sich in den Ammoniumsalznährlösungen wahrscheinlich um keine sehr günstigen Ernährungsverhältnisse für den *Mycoides* handelt, kann man wohl annehmen, daß die N-Quelle nicht ausreicht, um den für die Sporenbildung notwendigen Eiweißgehalt der Bakterienzelle zu liefern. Aber um auf alle diese Fragen näher eingehen zu können, muß man den Stoffwechsel erst genau kennen.

Aus den Untersuchungen im dritten Teil der Arbeit ergibt sich, daß Beziehungen zwischen der Wasserstoffionenkonzentration des Fundortes und dem Wachstum von *Bac. mycoides* in dem Sinne, daß die auf saurem Boden gefundenen Stämme besser in sauren Nährlösungen wachsen und umgekehrt alkalische besser in alkalischen Nährlösungen, nicht festgestellt werden konnten, wohl aber ließen sich Unterschiede in der Wachstumsintensität bei den Stämmen von verschiedenen Standorten nachweisen.

Wider Erwarten wuchs *Bac. mycoides*, obwohl er bisher in bezug auf Stickstoff als heterotroph gilt, in Nahrlösungen mit NH_4NO_3 und $(NH_4)_2SO_4$ als einziger Stickstoffquelle.

Zusammenfassung.

1. Die Verbreitung des *Bac. mycoides* im Hochgebirge ist im wesentlichen abhängig von der Düngung und Bearbeitung des Bodens, gleichgültig welcher Zusammensetzung das anstehende Gestein ist. Die Höhengrenzen für die Verbreitung des *Bac. mycoides* stimmen mit den Beweidungsgrenzen überein. In vegetationslosen Böden kommt *Bac. mycoides* nur dann vor, wenn Reste organischer Substanz vorhanden sind. An Nordhängen ist der *Mycoides*-Gehalt des Bodens bedeutend geringer als an Südhängen, wie an zwei Beispielen genauer ausgeführt wurde.

2. Die Wasserstoffionenkonzentration des Bodens ist für die Verbreitung *nicht* maßgebend, wenn es sich um Dungböden handelt, sie scheint aber Einfluß auf die Verbreitung in dungfreien Böden zu haben. Auch auf die vegetative Tätigkeit und auf die Sporenbildung des *Bac. mycoides* scheinen die Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration des Bodens keinen Einfluß zu haben. Die Schwankungen des Boden-p_H sind nicht sehr stark.

3. Die Schwankungen im *Mycoides*-Gehalt des Bodens und das Verhältnis der Zahl von vegetativen Zellen und Sporen zueinander scheinen allein abhängig zu sein von den *klimatischen* Verhältnissen

des Standortes. Der Gesamtkeimgehalt erreicht zur Zeit der Hauptvegetationsperiode allgemein die höchsten Werte und fällt gegen den Herbst.

4. In den Bodenproben vom Hafelekar (Kalk) und Patscherkofel (Urgestein) wurden *Glattformen* und *Rauhformen* des Bazillus und alle Übergänge von einer Form zur anderen gefunden.

5. Nach dem Verfahren zur quantitativen Gewinnung von Bakterientrockensubstanz aus flüssigen Nährmedien mit dem Membranfilter von *Zsigmondy* wurde festgestellt, daß eine Abhängigkeit im Wachstum von der Wasserstoffionenkonzentration der Nährlösungen in dem Sinne, daß die auf saurem Boden gefundenen Stämme besser in sauren Nährlösungen wachsen und umgekehrt die in alkalischen Proben gefundenen besser in alkalischen Nährlösungen, *nicht* vorhanden ist. Wohl aber konnten Unterschiede in der Wachstumsintensität zwischen den Stämmen von verschiedenen Standorten in dem Sinne festgestellt werden, daß Stämme aus gedüngtem Boden die C- und N-Quellen besser ausnutzten als Stämme von ungedüngtem Boden.

6. Es wurde Wachstum mehrerer Stämme des *Bac. mycoides* in Nährlösungen mit Glycerin als C-Quelle festgestellt, die als einzige Stickstoffquelle *Ammoniumsalze* enthielten.

Vorliegende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Innsbruck ausgeführt. Für das rege Interesse an der Arbeit und für die vielen Anregungen sage ich Herrn Prof. Dr. *Adolf Sperlich* meinen aufrichtigsten Dank.

Literatur.

1) *W. Bavendamm*, Beih. z. Bot. Centralbl. **49**. Erganzungsbd., 1, 1932. — 2) *G. Klein* u. *M. Steiner*. Österr. Bot. Zeitschr. **78**, 289, 1929. — 3) *D. Fehér*, Mathem.-Naturwiss. Ber. Ungarn **37**, 51, 1930. — 4) *Rob. L. Starkey*, Soil Sci. **32**, 367, 1931. — 5) *S. Winogradsky*, Ann. Inst. Pasteur. **48**, 89, 1932. — 6) *N. Cholodny*, diese Zeitschr. **1**, 620, 1930. — 7) *Lehmann* u. *Neumann*, Bakteriologische Diagnostik. Lehmann, München 1926. — 8) *W. Omeliansky*, Handwörterbuch d. Naturwiss. **1**, 810, Jena 1912. — 9) *W. Hoss*, Beih. z. Bot. Centralbl. **49**, 1, 1932. — 10) *C. Stapp* u. *H. Zycha*, diese Zeitschr. **2**, 493, 1931. — 11) *E. Grundmann*, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkde. II. Abtlg. **89**, 1933. — 12) *H. Glinka-Tschernorutzky*. Biochem. Zeitschr. **206**, 301, 1929.

(Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien.

III. Mitteilung[1]:

Über die Pilzsymbiose holzfressender Insektenlarven.

Von

Wolfgang Müller.

Mit 31 Textabbildungen.

(Eingegangen am 8. Oktober 1933.)

Inhalt.

I. Einleitung.

1. Fragestellung.

Unsere Kenntnisse von den symbiontischen Beziehungen zwischen Tieren und pflanzlichen Mikroorganismen haben sich in den letzten Jahren sehr erweitert. *Buchner* ist mit eigenen Forschungen an der Entwicklung des Gebietes wesentlich beteiligt. Außerdem verdanken wir ihm eine zusammenfassende, kritische Darstellung des gesamten Tatsachenmaterials (1930). Dabei ging *Buchner* von der Arbeitshypothese aus, daß die symbiontischen Verbindungen von Tieren mit Algen, Pilzen und Bakterien die Wirtstiere zu einer Leistungssteigerung uber ihre eigenen Moglichkeiten hinaus befahigen. Die Annahme, daß es sich bei diesen Mikroorganismen tatsachlich um Symbionten und nicht etwa um Parasiten handelt, wird nach *Buchner* dadurch gestützt, daß die Symbionten innerhalb einer symbiontenfuhrenden Art regelmäßig vorhanden sind, und daß ferner in vielen Fallen das Fortbestehen der Symbiose durch Übertragungseinrichtungen gesichert ist.

---

[1] I. und II. Mitteilung siehe *Schwartz* (1924, 1932).

Die zahlreichen Symbiosen von Tieren mit Pilzen und Bakterien zeigten, daß symbiontische Einrichtungen vornehmlich bei Tiergruppen mit einseitiger Ernährung zu finden sind, und *Buchner* schloß daraus, daß die Symbionten in Beziehung zur Ernährung ihrer Wirte stehen.

Die experimentelle Prüfung der Hypothese *Buchners* ist erst vereinzelt in Angriff genommen worden. Es ist die Aufgabe dieser Arbeit, auf einem Teilgebiet die Brauchbarkeit dieser Hypothese experimentell zu prüfen. Als Untersuchungsobjekte wurden die Holzfresser gewählt, über deren Physiologie schon einige zum Teil widersprechende Angaben vorliegen.

Für die experimentelle Prüfung ergeben sich folgende Gesichtspunkte, die auch *Buchner* zum Teil angeführt hat:

1. Erforschung der Leistungen der Symbionten in Reinkultur, insbesondere ihrer enzymatischen Fähigkeiten.
2. Erforschung der Leistung des tierischen Verdauungssystems an Hand von Fermentversuchen und von vergleichenden Futter- und Kotanalysen.
3. Symbiontenfreie Züchtung der Wirte und Prüfung auf Ausfallerscheinungen.

Die beiden ersten Möglichkeiten wurden in dieser Arbeit näher verfolgt, während der dritte Punkt nicht berücksichtigt werden konnte, da er nur bei besonders geeigneten Objekten Erfolg verspricht.

Im Zusammenhang mit dem Symbioseproblem erscheint es wichtig, soweit als möglich das Vorkommen der symbiontischen Organismen außerhalb der Wirtstiere, etwa im Nahrungssubstrat, zu verfolgen, um damit einen Anhaltspunkt über die Entstehung der Symbiose zu gewinnen. Ferner verdienen alle Erscheinungen Beachtung, die etwa auf parasitische Störungen des symbiontischen Gleichgewichts hinweisen.

2. *Verbreitung der Symbiose bei Holzfressern.*

Innerhalb der Gruppe von Nahrungsspezialisten mit Holznahrung kann man nach *Buchner* drei Symbiosetypen unterscheiden:

1. Die Symbionten entfalten ihre Tätigkeit außerhalb des Tierkörpers.
2. Die Symbionten sind im Darmlumen der Tiere wirksam.
3. Die Symbionten leben intracellular in bestimmten Körperzellen der Tiere.

Die erste Gruppe umfaßt diejenigen Insekten, die nur indirekt von Cellulose leben, indem ihnen Pilze zur Nahrung dienen, die sie auf Holz züchten. Die Tiere selbst nehmen niemals oder nur selten Holz in ihren Darm auf. Zu diesen Pilzzüchtern gehören die holzbrütenden *Ipiden* (Borkenkäfer), die *Lymexyloniden* (Werftkäfer) mit der Gattung *Hylecoetus* und wahrscheinlich die *Platypodiden* (Kernkäfer). *Buchner* rechnet auch die von ihm entdeckte Symbiose der *Siriciden* (Holzwespen) hierher. Bei den holzbohrenden *Ipiden* und bei *Hylecoetus* sind die Wände der vom Bohrmehl befreiten Gänge mit *Ambrosiapilz*rasen überwachsen, die von den Larven abgeweidet werden.

Die *Siriciden* unterscheiden sich insofern von den erwähnten „*Ambrosiakäfern*“, als die Larven das gesamte Bohrmehl den Darm passieren lassen

und den Kot fest hinter sich in den Gang stopfen. Bis jetzt ist der Symbiosepilz nur in den Übertragungseinrichtungen der Weibchen gefunden worden.

Die zweite Gruppe umfaßt die Symbiosen bei *Termiten*, *Lamellicorniern* und *Tipuliden*, bei denen Mikroorganismen im Darmlumen der Tiere leben. In einem Falle (*Termiten*) ist eine Celluloseverdauung durch *Flagellaten* nachgewiesen (*Cleveland*, 1926, 1928). Bei den „Gärkammerlarven" der *Lamellicornier* konnten *Werner* (1926) und *Wiedemann* (1930) im Larvendarm cellulosespaltende *Bakterien* nachweisen; neuerdings wird jedoch das Celluloseverdauungsvermögen der „Gärkammerlarven" wieder in Abrede gestellt (*Ripper*, 1930).

Bei der dritten und größten Gruppe (Larven aus den Käferfamilien der *Anobiiden*, *Cerambyciden*, *Curculioniden*, *Buprestiden* usw.) leben die Symbionten intracellular. Während für die beiden ersten Gruppen die Bedeutung der Symbiose für die Celluloseverwertung wenigstens in einigen Fällen sicher gestellt ist, sind wir bei den intracellularen Symbiosen nur auf Vermutungen angewiesen. Besonders hier finden wir das Fortbestehen der Symbiose durch Übertragungseinrichtungen gesichert.

Daß das intracellulare Vorkommen von Mikroorganismen eine Bedeutung für die Ernährungsphysiologie des Wirtstieres besitzt, hat schon *Karawaiew* (1899) vermutet, als er die Darmblindsäcke von der omnivoren *Sitodrepa panicea* (*Anobiidae*) studierte. *Escherich* (1900) hat *Sitodrepa* ebenfalls untersucht und kam zu dem Ergebnis, daß die symbiontischen *Hefen* wahrscheinlich bei der Verdauung eine Rolle spielen. Nachdem der ganze Komplex der verschiedenartigsten symbiontischen Einrichtungen bei Holzfressern mehr und mehr bekannt geworden, stellte schließlich *Buchner* (1927), in Analogie zu anderen teilweise gesicherten Fällen, die Hypothese auf, daß auch die intracellularen Symbionten bei Holzfressern die Cellulosevergärung im Darm der Tiere besorgen d. h. die dazu notwendigen Fermente liefern, die dem Tierdarm an sich fehlen sollen.

Neben typischen Holzfressern finden wir hier auch Arten, deren Nahrung vollkommen anders beschaffen ist, ohne daß in diesen Fällen die Symbiose fehlt. Einige Formen sind Vorratsschädlinge, wie *Sitodrepa* (*Anobiiden*), *Oryzaephilus* (*Cucujiden*), *Calandra* (*Curculioniden*). Andere wieder ernähren sich von allerlei lebenden und toten Pflanzenteilen, Blättern, Stengeln, Wurzeln, Blütenböden und Früchten, wie zahlreiche Vertreter der *Curculioniden* und *Buprestiden*. Eine solche Ernährungsweise haben auch einige weitere Insektengruppen mit Symbiosen, die *Buchner* an die Holzfresser anschließt, nämlich die *Trypetiden* (Bohrfliegen), *Lagriiden* (Wollkäfer), *Chrysomeliden* (Blattkäfer) mit der Gattung *Donacia* und die Dipterengattung *Dasyhelea*. Auch unter den Gärkammerlarven (*Lamellicornier* und *Tipuliden*) gibt es neben Holzfressern viele Formen, die sich von Moder, Schlamm, Mist und Wurzeln ernähren.

Wir kennen jedoch auch zahlreiche Fälle, bei denen Holznahrung ohne Symbiose bewältigt wird (*Cossus*, *Teredo*, gewisse *Cerambyciden*). *Heitz* (1927) hat die Anschauung vertreten, daß Holzverdauung ohne Symbiose wohl möglich ist, daß aber die Symbionten das Tier physiologisch leistungsfähiger machen und ihm einen höheren Selektionswert verleihen.

3. Untersuchungsmaterial.

Für die folgenden Untersuchungen wurden aus der Fülle der holzfressenden Insekten einige Arten mit Pilzsymbiose ausgewählt, nämlich

von den Anobiiden[1]: *Ernobius abietis*, *Ernobius mollis*, *Xestobium rufovillosum*, *Anobium striatum* und *Dendrobium* (*Anobium*) *pertinax*;

von den Cerambyciden: *Rhagium bifasciatum*, *Rhagium inquisitor*, *Rhagium mordax*, *Oxymirus cursor* und *Leptura rubra*;

von den Siriciden: *Sirex gigas*.

Das Untersuchungsmaterial war mitunter recht schwierig zu beschaffen und nicht immer in ausreichender Menge vorhanden. Zum Teil konnte ich es selbst sammeln, zum Teil verdanke ich es der Freundlichkeit zahlreicher Helfer. Besonders gedankt sei den Forstzoologischen Instituten der Universitat Freiburg und der Forstlichen Hochschule Hann. Munden sowie der Badischen und Pfalzischen Forstverwaltung.

4. Lebensweise und symbiontische Einrichtungen der untersuchten Gruppen.

Die *Anobiiden*-Larven leben meist in geschlagenem und bearbeitetem Holz, seltener in anbruchigen Baumen; daneben kommen aber auch einige Arten in jungen Trieben, in Zapfen und in Vorraten vor. Die Substrate zeichnen sich im allgemeinen durch eine betrachtliche Trockenheit aus. Unsere heimischen *Cerambyciden*-Larven finden sich fast ausnahmslos in Holzgewachsen, teils im Holzkorper lebender oder toter Baume, in Baumstumpfen usw., teils unter der Rinde von stehendem und geschlagenem Holz. Manche Arten befallen stark zersetzte und verpilzte Substrate. Im allgemeinen lieben die Bockkafer feuchtere Substrate, doch kommen auch Arten in ganz trockenem Bauholz vor. Die Larven der *Siriciden* leben in stehendem und geschlagenem gesunden Holz.

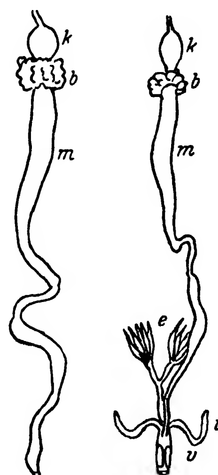


Abb. 1.
Larvaler und imaginaler Darm eines *Anobiiden* (*Anobium striatum*), schematisiert.
k = Kaumagen, b = Blindsäcke, m = Mitteldarm, e = Eirohren, i = Intersegmentalschläuche, v = Vaginaltaschen.

Die Larven und Imagines der *Anobiiden* besitzen an ihrem Mitteldarm gleich hinter dem Kaumagen sackformige Ausstulpungen, die bei manchen Formen betrachtliche Große erreichen können (Abb. 1). In bestimmten Wandzellen (Mycetocyten) dieser Blindsäcke leben symbiontische *Hefen*. Die weiblichen Kafer besitzen pilzgefullte Organe am Legeapparat, die es ermöglichen, daß bei der Eiablage jedes Ei mit Hefezellen beschmiert wird. Wenn die jungen Larven ausschlupfen, fressen sie einen Teil der Eischale und infizieren sich dadurch aufs neue.

[1] Die omnivore *Sitodrepa panicea* habe ich bei meinen Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Die Hefen dringen in die Darmwand ein und geben wieder zur Bildung der Blindsäcke Anlaß.

Die *Cerambyciden* zeigen ganz ähnliche Verhältnisse, unterscheiden sich aber grundlegend dadurch, daß nur die Larven, nicht aber die Imagines Blindsacke mit Symbionten besitzen (Abb. 2). Die Blindsäcke sind im allgemeinen nicht so stark entwickelt wie bei den *Anobiiden*. Am weiblichen Genitalapparat sind wieder Übertragungseinrichtungen vorhanden.

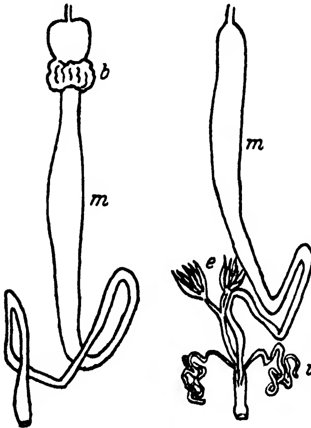


Abb 2
Larvaler und imaginaler Darm eines *Cerambyciden* (*Oxymirus cursor*), schematisiert. Bezeichnungen wie bei Abb 1

Die weiblichen Imagines der *Siriciden* besitzen am Legeapparat zwei komplizierte Pilzspritzen, die es wohl ermoglichen, zugleich mit den Eiern auch die Symbionten ins Holz einzufuhren. Von den Larven sind keine Mycetocyten oder Mycetome bekannt. *Buchner* vermutet, daß der symbiontische Pilz im Holz der Larvengange gedeiht, dann mit den Nagespanen in den Darm gelangt und dort in seiner Eigenschaft als Enzymproduzent die Celluloseverdauung ermoglicht.

II. Isolierung und Kultur der Symbionten.

1. *Methode.*

Die Praparation der *Anobiiden*-Larven erfolgte unter dem binokularen Mikroskop. Nach Reinigung der Tiere mit Alkohol wurde in einem Tropfen Wasser mit einer kleinen Operationsschere der Kopf abgeschnitten und der Korper der Lange nach aufgetrennt. Dann konnte mit zwei Nadeln der Darm mit den Blindsacken leicht aus dem Fettgewebe herauspprapariert werden. Die Praparation der Imagines gestaltete sich insofern einfacher, als nach der Reinigung mit Alkohol ein „Auseinanderziehen" des Insektes zwischen Thorax und Abdomen mit Hilfe von zwei Nadeln genugte, um den Darmteil mit den Blindsacken freizulegen. Handelte es sich darum, ganze Darme und die Beschmierorgane am weiblichen Genitalapparat herauszupraparieren, so mußte wie bei den Larven verfahren werden. Die Praparation der großen *Cerambyciden*-Larven wurde unter Wasser in einer Präparierschale vorgenommen, in der die Tiere nach dem Öffnen in der üblichen Weise mit Nadeln festgesteckt waren.

Zur Vermeidung von Infektionen wurde mit sterilen Instrumenten und mit sterilem Wasser gearbeitet. Besonders die Untersuchungen über die Darmflora ließen diese Maßnahmen notwendig erscheinen.

Für Isolierungsversuche war besonders darauf zu achten, die Darmanhänge, die ja mit dem Darmlumen in Verbindung stehen, außerlich steril zu bekommen. Nachdem das Darmstuck mit den Anhängen von den

übrigen Darmteilen abpräpariert war, wurde das nunmehr ringförmige Gebilde aufgeschnitten und mehrmals mit steriler *Ringer*lösung durchgespült. Mit einer ausgeglühten Platinnadel übertrug ich die einzelnen Darmteilchen von einem Röhrchen mit steriler Waschflüssigkeit in das nächste. Zu Kulturversuchen in den gewöhnlichen Nährböden erwies sich diese Vorbehandlung als ausreichend. Jedoch für empfindlichere Versuche, so zur Injektion in die Lymphe lebender Insekten, waren die Anhänge noch nicht genügend gereinigt, da es äußerst schwierig ist, aus den reichverzweigten Aussackungen alle Nahrungsteilchen mit den daran haftenden Bakterien zu entfernen. In diesem Falle behandelte ich die Anhänge 24 Stunden lang mit *Ringer*lösung, der 1 bis 2 % Citronensäure zugesetzt war. Kontrollversuche bei *Rhagium* haben gezeigt, daß hierdurch die Symbionten nicht geschädigt werden. Auch dann traten noch Infektionen durch Bakterien auf, doch konnten immerhin haufig bakterienfreie Impfungen erzielt werden.

Zur Herstellung einer geeigneten Impfflüssigkeit wurden anfanglich die gewaschenen Darmanhange in ein Röhrchen mit 1 bis 2 ccm Nährlösung oder *Ringer*lösung gebracht, mit der Platinnadel an der Wand des Röhrchens verrieben und kraftig geschüttelt. Es zeigte sich jedoch, daß nur ein geringer Teil der Symbionten in der Flüssigkeit zu finden war, die meisten dagegen im unverletzten Mycetocyten zurückblieben. Es mußte also ein anderer Weg eingeschlagen werden, der darin bestand, daß die Darmanhange im Impfkasten in einem sterilen Uhrschälchen mit einem rundgeschmolzenen sterilen Glasstab in ein paar Tropfen Flüssigkeit verrieben wurden, bis eine feine Emulsion entstanden war, die nach Bedarf verdünnt werden konnte.

Als Nahrboden dienten bei den Isolierungsversuchen

1. Würze aus Malzextrakt, spez. Gew. 1,025 und 1,015.
2. Würze 1 : 1 mit *Ringer*losung verdünnt. (*Ringer*losung: Aqua dest. 100 ccm, NaCl 0,7 g, KCl 0,025 g, $CaCl_2$ 0,3 g.)
3. Most aus Dorrobst, spez. Gew. 1,025.
4. Most aus Feigen, spez. Gew. 1,025.
5. Hefewasser (100 g Preßhefe + 1 Liter Wasser).
6. Glucose-Alanin-Losung (1 g Glucose, 0,05 g KH_2PO_4, 0,025 g $CaCl_2$, 0,08 g Alanin, 100 ccm Wasser).
7. Würze-Agar, Feigenmost-Agar, Würze-Gelatine.
8. Rindenextrakt-Agar (20 g mulmige Rindenstücke von einem Baumstumpf mit *Rhagium*befall mit 100 ccm Wasser gekocht und filtriert, Zusatz von 1 % Glucose und 1,5 % Agar).
9. Holzextrakt-Agar (20 g frisches, fein gespaltenes Fichtenholz mit 100 ccm Wasser gekocht und filtriert, Zusatz von 2 % Dextrin, 0,5 % Pepton und 1,5 % Agar).
10. Fleischwasser (hergestellt aus 1 Pfund gehacktem Rindfleisch und 1 Liter Leitungswasser ohne weitere Zusätze).
11. Lymphe lebender Insekten.

Heitz (1927) hat darauf hingewiesen, daß man unbedingt das Verhalten einzelner Zellen mikroskopisch verfolgen muß, um sicher zu sein, daß der angewachsene Organismus mit dem aus den Blindsäcken entnommenen identisch ist. Zu diesem Zweck benutzte *Heitz* feuchte Kammern mit Würzeagartropfen. Ich verwendete vor allem die Tröpfchenmethode nach *Lindner*, um das Wachstum der symbiontischen Organismen zu kontrollieren, weil man dabei die Möglichkeit hat, bei richtiger Wahl der

Verdünnung gleichzeitig Einzellkulturen der betreffenden Organismen zu gewinnen. Um möglichst oft eine Durchsicht der Mikrokulturen vornehmen zu können, stellte ich in zehn bis zwölf Mikroskopen geeignete Tröpfchen zur Dauerbeobachtung auf und fertigte bei den Durchsichten, die tagsüber alle 2 bis 3 Stunden vorgenommen wurden, soweit Veränderungen eingetreten waren, eine Lageskizze der Pilze an. Bei Organismen, die der künstlichen Kultur schwer zugänglich waren, wurde versucht, bei höherer Einsaat (etwa 10 bis 20 Zellen pro Tropfchen) Wachstum zu erzielen, da *Heitz* für *Sitodrepa* angibt, daß die Symbionten bei niederer Einsaat nicht wachsen. Bei schlecht wachsenden Organismen verwendete ich auch wie *Heitz* Würzeagartropfen in feuchten Kammern als Nährboden. Daneben wurden auch Großkulturen in Würzerohrchen und auf anderen Nahrmedien angelegt, wobei stets geprüft werden mußte, ob die gewachsenen Pilze mit denen in den Tropfchenkulturen identisch waren.

Die Kultur in Lymphe lebender Insekten, die vor allem in den Fällen angewandt wurde, in denen aus den gewohnlichen Nahrboden kein Wachstum eintrat, erfolgte in der Weise, daß die Darmanhange, die teilweise mit citronensaurehaltiger *Ringer*losung vorbehandelt waren, nach Abspülen in steriler *Ringer*losung unter sterilen Bedingungen fein zerrieben und in die betreffenden Insekten injiziert wurden. Ich arbeitete mit Seidenraupen, spater, in der ungünstigen Jahreszeit, mit Puppen von *Sphinx Ligustri* und *Pieris brassicae* oder mit den Raupchen der Mehlmotte, die sich in Mehl und anderen starkehaltigen Substraten leicht kultivieren lassen. Bei Seidenraupen und Puppen erfolgte das Einführen der Impfflüssigkeit mit einer Injektionsspritze mit dünner Nadel. Die Nadel wurde seitlich in eines der mittleren Segmente eingestochen und die Flüssigkeit flach unter die Korperwand eingespritzt. Bei Seidenraupen injizierte ich $^1/_{10}$ bis 1 ccm einer milchig trüben Aufschwemmung von Pilzen. Nach der Injektion floß meistens etwas Lymphe aus, die mit Filtrierpapier aufgesogen wurde. Die Tiere erholten sich in der Regel ziemlich rasch. Bei den Seidenraupen verklebte die Stichwunde schnell, so daß keine Gefahr des Verblutens bestand. Bei den Puppen dagegen war es notwendig, nach der Injektion die Einstichoffnung mit Paraffin zu verschließen, da sonst die gesamte Korperflüssigkeit auslief. Zur Injektion in die kleinen Mehlmottenraupchen verwendete ich feine, zu Kapillaren ausgezogene und mit Wattefilter versehene sterile Rohrchen, mit denen nach dem Einstechen der Kapillare Impfflüssigkeit durch Einblasen in die Raupchen gebracht wurde (vgl. *Schwartz*, 1932). Nach einiger Zeit entnahm ich den Tieren etwas Lymphe zu Ausstrichpraparaten, die ich nach der Methode von *Schwartz* mit *Giemsa*-Losung farbte. Aus Seidenraupen und Puppen wurde mehrmals Lymphe zur Prufung entnommen, in der Regel nach 12 und 24 Stunden und nach 3 Tagen, manchmal schon nach 2 und 6 Stunden. Die Kleinheit der Mehlmottenräupchen gestattete nur eine einmalige Entnahme.

2. *Kulturversuche mit Anobiiden-Symbionten.*

a) Ernobius abietis Fbr.

Vorkommen. Die Larve lebt in den Spindeln und Schuppen abgefallener Fichtenzapfen. Die befallenen Zapfen sind meist daran zu erkennen, daß an der Ansatzstelle der Spindel etwas Fraßmehl zu bemerken ist.

Herkunft des Materials. Lange Grinde (nördlicher Schwarzwald).

Lokalisation der Symbionten. Die symbiontischen Organe wurden von *Buchner* (1921), *Heitz* (1927) und *Breitsprecher* (1928) untersucht.

Am vorderen Teile des larvalen Mitteldarmes, direkt hinter dem Kaumagen, befindet sich eine Anzahl von Blindsäcken, deren Epithel aus großen, mit Symbionten angefüllten Mycetocyten und aus sterilen Zellen mit Stabchensäumen gebildet wird. Die Mycetocyten treten gegenüber den sterilen Zellen an Zahl zurück. Die Zellkerne der Pilzzellen sind auffallig groß und allseits zackig deformiert. Die Darmanhänge der Imagines zeigen dieselben Verhaltnisse wie bei den Larven. Die Übertragungseinrichtungen am weiblichen Legeapparat sind als zwei schmale Vaginaltaschen ausgebildet; ferner befinden sich am Anfang des Darmscheiderohres zwei sogenannte „Kryptenzonen" mit eigentümlichen „Kryptenhaaren", in deren Schutz sich die Hefen aufhalten.

Symbionten. Die Symbionten hatte *Heitz* schon in Kultur. Sie sind meistens kreisrund, selten langlich oder einseitig etwas zugespitzt und sehr verschieden groß (Abb. 3). Fast jede Zelle enthält eine Vakuole. Große: 2,1 bis 5,0 μ lang, 2,1 bis 4,3 μ breit, im Mittel 3,5 μ lang und 3,2 μ breit. Die Blindsackorganismen der Imagines stimmen mit denen der Larven morphologisch uberein, ebenso die Pilze der Übertragungseinrichtungen.

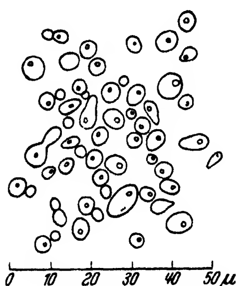


Abb 3.
Symbionten von *Ernobius abietis* aus den Mycetocyten

Kulturversuche. Darmanhange von vier Larven wurden in etwa 1 ccm Most verrieben. Die Aufschwemmung diente zur Herstellung

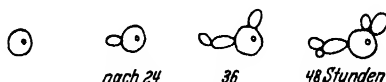


Abb. 4.
Vermehrung von *Ernobius abietis*-Symbionten im Wurzetropfen

von Tropfchenkulturen nach *Lindner* und zum Impfen von Wurze- und Wurzeagar-Rohrchen Auf Agar entwickelte sich sehr langsam eine weiße *Hefe* mit glanzender, glatter Oberflache; auch in der Wurze waren nach einigen Wochen ein Bodensatz und ein schwacher Hefering zu bemerken. Das Wachstum in den Tropfchenkulturen ist schlecht. Von 15 beobachteten Zellen sproßten nur vier. Nach 3 Tagen waren kleine Sproßverbande von sechs bis zehn Zellen entstanden (Abb. 4). Die Zellen, die nicht mehr weiterwuchsen, zeigten meist anfanglich starke Lichtbrechung und spater granuliertes Plasma. Die neugebildeten Zellen waren kugelig-oval bis kreisrund, mitunter auch langgestreckt. In den Sproßverbänden, die die Symbionten nach funftägigem Wachstum gebildet hatten (Abb. 5), fallen besonders die großen Mutterzellen auf, von denen die Sprossung ausging. Es schien, daß sie während der Sprossung im künstlichen Substrat an Größe zunahmen. In Wurze und auf Würzeagar waren dieselben Organismen gewachsen wie in den

Tröpfchenkulturen. Dieser Versuch wurde mehrmals unter ähnlichen Bedingungen wiederholt; stets ergab sich eine runde, *Torula*-ähnliche *Hefe*. Der Blindsackorganismus von *Ernobius abietis Fbr.* hat in künstlicher Kultur annahernd dieselbe Gestalt und Größe wie als intracellularer Symbiont. Dieselbe Hefe wurde aus den Blindsäcken der Imagines und aus den Übertragungseinrichtungen isoliert.

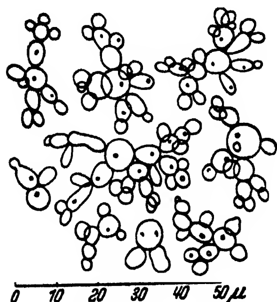


Abb. 5.
Symbionten von *Ernobius abietis*, Kultur in Most nach 5 Tagen.

b) Ernobius mollis L.

Vorkommen. Die Larven dieses Kafers werden besonders in Fraßstücksammlungen schadlich, wo sie berindete Stucke von Nadelholzern befallen. Die Larven leben unter der Rinde und fressen gewundene Rinnen und ganz kurze Gange in die äußersten Holzschichten.

Herkunft des Materials. Sammlung des Forstzoologischen Instituts Hann. Münden.

Lokalisation der Symbionten. *Breitsprecher* (1928) fand bei Larven und Imagines weitgehende Übereinstimmung mit *Ernobius abietis Fbr.* Nur die Vaginaltaschen sind großer und starker mit Pilzen angefüllt.

Symbionten. Auch die Symbionten kommen denen von *Ernobius abietis Fbr.* sehr nahe; sie sind annahernd kugelig und sehr verschieden groß. Langgestreckte Zellen werden jedoch kaum gefunden. *Breitsprecher* gibt eine Lange von 6 μ und eine Breite von 5 μ an und für die kleinsten Zellen einen Durchmesser von kaum 2 μ. Sprossung ist innerhalb der Mycetocyten selten. *Breitsprecher* will im lebenden Präparat in jeder Zelle einen Zellkern gesehen haben. Da die Kerne an ungefarbtem Material nicht sichtbar sind, wird vermutlich eine Verwechslung mit einem Zelleinschluß (Ölkörper) vorliegen.

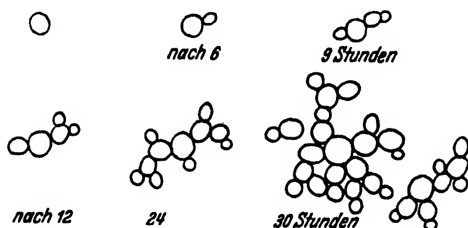


Abb. 6.
Vermehrung der Symbionten von *Ernobius mollis* im Würzetropfen.

Kulturversuche. Die Symbionten von *Ernobius mollis L.* wurden bis jetzt noch nicht kultiviert. Da die *Hefen* der beiden *Ernobius*-Arten sich morphologisch sehr ähnlich sind, war zu erwarten, daß auch die Symbionten dieser Art der Kultur zugänglich sind. Impft man die Darmanhänge einer Larve in Würze, so bildet sich etwa innerhalb einer Woche ein schwacher Bodensatz einer kleinzelligen, *Torula*-ähnlichen *Hefe* mit sehr schwachem Gärvermögen. Auf Würzegelatine entstanden

nach 8 Tagen kleine, weiße Kolonien und in Tröpfchenkulturen trat ebenfalls eine Vermehrung ein. Das Wachstum war besser als bei der vorigen Art. Von zehn zur Dauerbeobachtung eingestellten Zellen sind sieben gewachsen. Kleine Zellen scheinen leichter zu wachsen als große. Die Sprossung setzte nach 6 bis 10 Stunden ein und ging dann verhältnismäßig rasch vor sich, so daß nach 24 bis 36 Stunden schon bis 100 Zellen vorhanden waren (Abb. 6). Die neu entstandenen Zellen gleichen an Größe und Gestalt den Mutterzellen und bilden mitunter sehr umfangreiche Sproßverbände.

c) Xestobium rufovillosum De G.

Vorkommen. Die Larven kommen in Möbeln. Bauholz und ähnlichen Substraten vor, sind aber auch in stehenden, morschen Bäumen zu finden. Diese Art ist die größte aller *Anobien*arten und im Larvenstadium an dem beträchtlichen Durchmesser der Gänge und an den flachen, linsenförmigen Kotballen leicht zu erkennen.

Herkunft des Materials. Larven aus einem fichtenen Möbelstück und Imagines aus einem alten Fußboden.

Lokalisation der Symbionten. Bezüglich der Blindsäcke der Larven und Imagines besteht nach *Breitsprecher* (1928) eine vollkommene Übereinstimmung mit den gleichen Bildungen bei dem später zu besprechenden *Anobium striatum.* Als Übertragungseinrichtungen finden wir bei den Weibchen von *Xestobium* Vaginaltaschen, die in Form und Größe ebenfalls mit denen von *Anobium striatum* übereinstimmen. Außerdem befinden sich am oberen Ende des weiblichen Legeapparates zwei Intersegmentalschläuche.

Symbionten. Die Symbionten haben rundliche bis tränenförmige Gestalt, manchmal ist an einem Ende ein kleiner Zipfel zu erkennen (Abb. 7). Größe: 3,6 bis 6,8 μ lang, 2,8 bis 4,3 μ breit, im Mittel 4,4 μ lang und 3,4 μ breit. Die Zellen enthalten meist eine Vakuole. Sprossung ist nicht häufig, sie erfolgt stets am zugespitzten Ende. Ich hatte Gelegenheit, Pilze aus den larvalen und imaginalen Darmanhängen sowie aus den Intersegmentalschläuchen der Weibchen zu untersuchen und fand überall übereinstimmende Gestalt und Größe. Sprossende Zellen waren besonders in den larvalen Mycetocyten vorhanden.

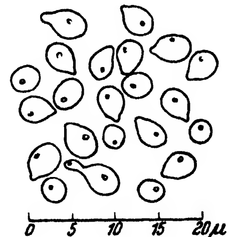


Abb. 7. Symbionten von *Xestobium rufovillosum* aus den Mycetocyten.

Kulturversuche. Heitz beschreibt die Pilze aus den Blindsäcken einer Larve, die aus einer morschen Weide stammte. Er konnte sie kultivieren und fand kräftiges Wachstum. *Breitsprecher* glaubte auf Grund der übereinstimmenden Formen der *Hefen* annehmen zu können, daß es sich um *Xestobium rufovillosum De G.* gehandelt hat.

Meine zahlreichen Versuche zur Kultivierung der Symbionten dieser Art verliefen alle negativ, trotz großer Variation der Nährmedien. (Würze verschiedener Konzentration, Most, Hefewasser, Würzeagar). In Tröpfchenkulturen und in feuchten Kammern auf Würzeagar zeigten die Zellen nach 10 bis 15 Tagen stark granulierten Inhalt. Anfänglich standen mir nur Larven verschiedener Herkunft zur Verfügung; später konnten auch Imagines aus alten Fußböden untersucht werden. Die Ergebnisse lassen es zweifelhaft erscheinen, ob die von *Heitz* untersuchte Larve wirklich zu *Xestobium rufovillosum* gehörte.

d) Anobium striatum Oliv.

Vorkommen. Diese Art ist im Volksmund unter dem Namen Holzwurm bekannt und findet sich sehr haufig in alten Mobeln.

Herkunft des Materials. Altes Mobelstück aus Erlenholz.

Lokalisation der Symbionten. Die Blindsäcke des larvalen Darmes übertreffen nach *Breitsprecher* an Größe alle derartigen bisher bei den *Anobien* beschriebenen Einrichtungen. Neben wenigen, sehr schlanken sterilen Zellen findet man große, prall mit Symbionten gefüllte Mycetocyten mit gezackten Kernen. Die Darmanhange der Imagines sind klein und unscheinbar; Mycetocyten und sterile Zellen unterscheiden sich in ihrer Form wenig von den typischen Mitteldarmzellen. Die imaginalen Pilzzellen enthalten nur wenig Symbionten. Dagegen sind die Übertragungseinrichtungen der Weibchen um so machtiger entwickelt. Außer zwei großen Vaginaltaschen am Ende der Scheide finden sich an ihrem Anfang zwei große, wurmformige, mit Pilzen gefüllte Intersegmentalschlauche.

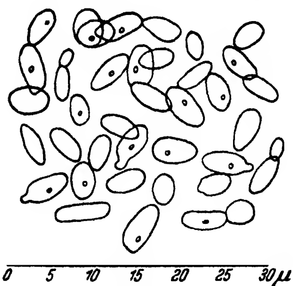


Abb. 8.
Symbionten von *Anobium striatum* aus den Mycetocyten.

Symbionten. Die Symbionten haben langgestreckte ovale bis ellipsoidische, manchmal zylindrische Gestalt (Abb. 8). Größe: 3,6 bis 8,2 μ lang, 2,2 bis 4,3 μ breit, im Mittel 6,5 μ lang und 5,0 μ breit. Sprossungsstadium findet man in den Mycetocyten selten. Auch hier ist in den meisten Fällen deutlich eine Vakuole sichtbar. Die Pilze der larvalen und imaginalen Blindsäcke und der Übertragungseinrichtungen gleichen sich in Größe und Gestalt.

Kulturversuche. Heitz (1927) ist es nicht gelungen die Symbionten einer Anobienlarve zu kultivieren, die *Breitsprecher* auf Grund der übereinstimmenden Form der Symbionten zu *Anobium striatum* rechnet.

Auch meine Versuche mit dieser Art verliefen stets negativ. Zu den Versuchen wurden Imagines und Larven verwendet. Als Nährböden dienten: Würzeagar, Hefewasser, Most, Würze in verschiedenen Konzentrationen und mit *Ringer*lösung verdünnte Würze. In den zur Dauerbeobachtung aufgestellten Tröpfchenkulturen bekamen nach

3 Wochen die Zellen granulierten Inhalt, ohne daß irgendwo Sprossung eingetreten wäre. Auch die mit dem Inhalt der Intersegmentalschläuche angelegten Kulturen in feuchten Kammern mit Würzeagar brachten keinen Erfolg.

e) Dendrobium (Anobium) pertinax L.

Vorkommen. In der Lebensweise ist *Dendrobium pertinax* der vorigen Art sehr ähnlich. Die Tiere werden etwas größer.

Herkunft des Materials. Ein Imago im botanischen Institut gefangen.

Lokalisation der Symbionten. Anatomisch wurde diese Art bis jetzt noch nicht genauer untersucht. *Breitsprecher* konnte an trockenem Sammlungsmaterial einen von *Anobium striatum Oliv.* abweichenden Bau des Legeapparates feststellen. Mir stand nur ein männlicher Käfer zur Verfügung, dessen Darmanhänge denen von *Xestobium rufovillosum* sehr ähnlich waren.

Symbionten. Die Symbionten gleichen am meisten denen von *Sitodrepa panicea.* Sie haben tränenförmige, selten ovale Form und zeigen oft am spitzen Pol Sprossungen (Abb. 9). Es war mir wegen Materialmangels nicht möglich, die Symbionten zu messen. Sie haben etwa die Größe der Blindsackhefen von *Xestobium rufovillosum De G.*

Kulturversuche. Es wurde versucht die Symbionten in Most und Würze zu kultivieren; in keiner der angelegten Tröpfchenkulturen war aber Wachstum eingetreten. Da mir nur ein Käfer zur Verfügung stand, ist diesem Ergebnis natürlich nicht allzuviel Bedeutung beizumessen.

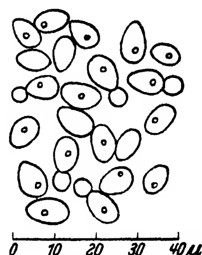


Abb. 9. Symbionten von *Dendrobium pertinax* aus den Mycetocyten.

3. Kulturversuche mit Cerambyciden-Symbionten.

a) Rhagium bifasciatum Fbr.

Vorkommen. Die *Rhagium*-Arten wohnen in berindeten Baumstümpfen, bei denen der Holzkorper kaum Zersetzungserscheinungen aufweist. Nach *Escherich* (1923) halten sie sich zwischen Rinde und Holz auf, ohne den Holzkörper selbst anzugreifen, was meine eigenen Beobachtungen bestätigen. Auch die aus Spänen verfertigten Puppenwiegen werden unter der Rinde angelegt. Wenn *Heitz* (1927) annimmt, daß die Hauptnahrung der *Rhagium*-Arten Holz ist, so kann dies höchstens in Ausnahmefällen zutreffen; in der Regel fressen die Larven Rinde. *Rhagium bifasciatum Fbr.* bewohnt ausschließlich Nadelholzstubben.

Herkunft des Materials. Herrenwieser See und Schliffkopf (nördlicher Schwarzwald), Königsfeld (mittlerer Schwarzwald).

Lokalisation der Symbionten. *Heitz* (1927) hat als erster das Vorkommen von Darmblindsacken und Mycetocyten in den Larven von *Rhagium*-Arten entdeckt. Später gab *Buchner* (1930) einige Ergänzungen.

Die einzelnen *Rhagium*-Arten stimmen untereinander weitgehend überein. Die Blindsäcke sind, verglichen mit den Darmanhängen der *Anobiiden*, im Verhältnis viel kleiner. Gewohnlich findet man 10 bis 12 Aussackungen ziemlich weit hinten an dem sich magenartig erweiternden

vorderen Abschnitt des Mitteldarmes, die wegen ihrer Kleinheit durch beträchtliche Abstände getrennt sind. Über Abweichung von diesem allgemeinen Typus soll später berichtet werden.

Buchner gibt für die *Rhagium*-Arten eine ziemlich schwache Besiedlung der Pilzzellen an, was auch meine Präparate bestätigen. Die Mycetocyten sind von gewöhnlichen Darmepithelzellen kaum verschieden. Sterile Zellen, wie bei den *Anobiiden*, fehlen. Die Weibchen von *Rhagium bifasciatum Fbr.* haben am Anfang des Darmscheiderohres zwei verhältnismäßig kleine, pilzgefüllte Intersegmentalschläuche.

Symbionten. Die Blindsackorganismen von *Rhagium bifasciatum Fbr.* wurden schon von *Heitz* (1927) beschrieben. Sie sind keulenförmig, manchmal kürzer und tränenförmig und einseitig zugespitzt. Kugelige und ovale Zellen sind sehr selten. Sproßstadien sind häufig; die Sprossung erfolgt in charakteristischer Weise stets am stumpfen Ende der Zellen (Abb. 10). Fast in jeder Zelle ist eine größere Vakuole sichtbar. Größe der Zellen: 2,2 bis 7,2 μ lang, 2,0 bis 3,5 μ breit, im Mittel 5,4 μ lang und 2,5 μ breit. Da mir keine weiblichen Käfer dieser Art zur Verfügung standen, konnte ich die Organismen der Intersegmentalschläuche nicht untersuchen. *Buchner* (1930) gibt in seiner Abb. 112d die Pilze der Übertragungseinrichtungen von *Rhagium bifasciatum Fbr.* wieder. Sie haben mit den Bewohnern der Blindsäcke wenig Ähnlichkeit; sie sind oval, manchmal schlauchförmig[1].

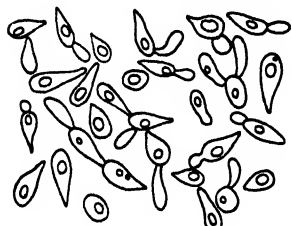


Abb. 10. Symbionten von *Rhagium bifasciatum* aus den Mycetocyten.

Kulturversuche. Heitz gelang die Isolierung der *Rhagiumhefe*; er gibt an, daß der Pilz in Kultur größere Zellen bildet.

Die Kultur der Symbionten von *Rhagium bifasciatum Fbr.* wurde mit verschiedenem Material versucht und lieferte stets ein positives Ergebnis. Auf festen Nährböden (Würzeagar, Würzegelatine, Feigenmostagar, Rindenextraktagar und Holzextraktagar) bildeten die Symbionten schwach gelbliche, feuchtglänzende Kolonien. In Nährlösungen (Hefewasser, Most, Feigenmost, Würze verschiedener Konzentrationen, Würze mit Glucose und Alaninzusatz) war nach 8 Tagen ein flockiger Bodensatz und ein Hefering und in manchen Fällen eine dünne Haut entstanden. In allen Kulturen traten größere und kleinere Sproßverbände einer kugelig-ovalen Hefe auf, die den ursprünglichen Symbionten wenig ähnlich sah. In diesem Falle war es also besonders wichtig,

---

[1] Es ist nicht ausgeschlossen, daß hier ein Versehen vorliegt, da auf *Buchners* Abb. 117c (Querschnitt durch ein intersegmentales Organ derselben Art) deutlich die typische keulenförmige Gestalt der Pilze zu erkennen ist.

das Wachstum der Symbionten genau mikroskopisch zu kontrollieren. In Tröpfchenkulturen mit Most oder Würze gingen die Pilze meist alle nach 2 bis 3 Stunden zur Sprossung über. Es bildeten sich ebenfalls verhältnismäßig langgestreckte, jedoch nicht zugespitzte Zellen. Die später entstandenen Zellen zeigten mehr kugelig ovale Form (jung kreisrund) (Abb. 11). Hatten die Sproßverbände 15 und mehr Zellen erreicht (nach etwa 12 bis 15 Stunden), so begannen sich Zellgruppen abzulösen. Nach 24 Stunden boten die Tröpfchenkulturen dasselbe Bild, das wir von den Großkulturen her kennen (Abb. 12). Zwischen den typischen kugelig-ovalen Hefen fand sich ab und zu eine Zelle von mehr tranenförmiger Gestalt.

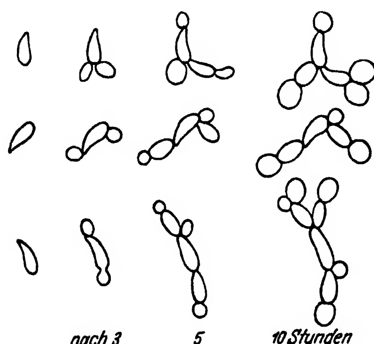


Abb. 11
Vermehrung der Symbionten von *Rhagium bifasciatum* im Wurzetropfen.

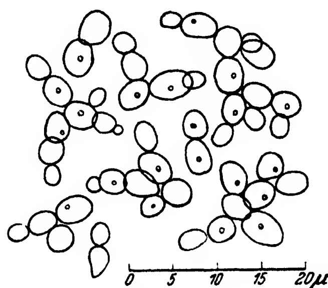


Abb. 12
Symbionten von *Rhagium bifasciatum*, Kulturform in Würze, 24 Std. alt.

Um festzustellen, ob individuelle Unterschiede zwischen den Symbionten verschiedener Tiere bestehen, wurden die Blindsackorganismen einer großeren Anzahl von Larven verschiedenen Alters isoliert; die Untersuchung ergab jedoch stets den gleichen Organismus.

Ein etwas anderes Bild erhalt man, wenn man als Kulturmedium Fleischwassergelatine verwendet. Die Blindsackhefe bildete unter diesen Umständen unter Verflussigung der Gelatine hochstens ganz kleine Sproßverbande (bis drei Zellen). Das mikroskopische Bild zeigte eiförmige bis tranenförmige Zellen, die in ihrer Gestalt der ursprunglichen Symbiontenform etwas näher kamen, aber bei weitem nicht so langgestreckt waren. Wurden diese Zellen in Würze abgeimpft, so entstanden alsbald die typischen Sproßverbände kugelig-ovaler Zellen.

b) Rhagium inquisitor L.

Vorkommen. Bezüglich des Vorkommenn gilt für *Rhagium inquisitor L.* das gleiche, wie für die vorige Art.

Herkunft des Materials. Strengen (Arlberg).

Lokalisation der Symbionten. Die Darmblindsacke sind ahnlich gebaut wie bei *Rhagium bisfasciatum Fbr.*

Symbionten. Auch die Symbionten gleichen in Größe und Gestalt denen der vorigen Art.

Kulturversuche. Die Kultur gelang in Würze sehr leicht; der Pilz verhält sich wie der Symbiont von *Rhagium bifasciatum Fbr.* Aus der „Symbioseform“ entstand die kugelig-ovale „Kulturform“.

c) Rhagium mordax De G.

Vorkommen. Die Larve von *Rhagium mordax De G.* lebt hauptsächlich unter der Rinde von Laubholzstöcken (Eiche, Buche, Birke), ist jedoch auch in Nadelholzstöcken zu treffen.

Herkunft des Materials. Aus Buche: Schliffkopf (nördlicher Schwarzwald); aus Fichte: Ochsenkopf (nordlicher Schwarzwald).

Lokalisation der Symbionten. Vgl. *Rhagium bifasciatum Fbr.*

Symbionten. Die Symbionten unterscheiden sich von der Hefe von *Rhagium bifasciatum Fbr.* und *inquisitor L.* höchstens dadurch, daß zwischen den typischen langgestreckten, einseitig zugespitzten Zellen mit Sprossung am stumpfen Ende, oft ovale bis kugelige Formen zu finden sind, die manchmal kleine Sproßverbande von bis zu sechs Zellen bilden (Abb. 13). Große 2,8 bis 6,4 μ lang, 1,8 bis 3,6 μ breit, im Mittel 5,0 μ lang und 2,5 μ breit.

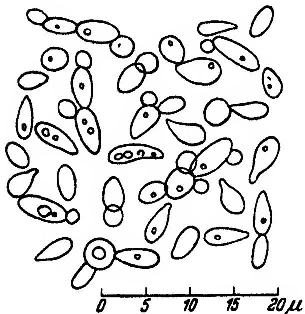


Abb. 13.
Symbionten von *Rhagium mordax* aus den Mycetocyten.

Kulturversuche. Die Symbionten von *Rhagium mordax De G.* ließen sich ebenso leicht kultivieren, wie die der beiden anderen Arten. Das Wachstum ging in der gleichen Weise vor sich und fuhrte ebenfalls zu kugelig-ovalen Zellen.

d) Oxymirus cursor L.

Vorkommen. *Oxymirus cursor L.* ist als typisches Gebirgstier in den großen Koniferenwaldern des Schwarzwaldes sehr verbreitet. Die Larve lebt im Innern stark zersetzter Nadelholzstümpfe und in gefallenen Stammen und Stangen. Die mit Kot vollgestopften Gange durchziehen nach allen Richtungen das Holz, das auf diese Weise fast vollkommen in eine braune, mehlige Masse verwandelt wird.

Herkunft des Materials. Belchen (südlicher Schwarzwald), Königsfeld (mittlerer Schwarzwald), Lange Grinde und Schliffkopf (nördlicher Schwarzwald), Strengen (Arlberg).

Lokalisation der Symbionten. Die Symbiontenorgane von *Oxymirus cursor L.* wurden von *Buchner* (1930) untersucht. Die Larve dieser Art besitzt die größten bisher bei den *Cerambyciden*-Larven gefundenen Darmanhänge, die ähnlich lokalisiert sind, wie bei den *Rhagium*-Arten. Vier umfangreiche, stark gekrauselte Polster umgeben als breiter Gürtel den Darm. Die Mündung der Ausstülpung in den Darm ist ziemlich weit. Auf den Gipfeln der sekundaren Falten sind Partien hoher, steriler Zellen

zu bemerken, die an die entsprechenden Bildungen bei den *Anobiiden* erinnern. Die Mycetocyten sind groß und stark mit Pilzen gefüllt. Ich konnte in einigen Schnittpräparaten feststellen, daß die Pilze sich alle im äußeren Teile der Mycetocyten befinden; von dem etwa in der Mitte der Zellen liegenden großen Kern ab, dem Darmlumen zu, sind im Plasma kaum noch Hefen vorhanden. Dieselbe Erscheinung hat *Heitz* (1927) bei *Leptura rubra* beobachtet. Auch die von *Buchner* und *Heitz* festgestellte Abgabe von symbiontenhaltigen Plasmaklumpen aus den Mycetocyten in das Lumen der Blindsacke ließ sich in meinen Präparaten nachweisen.

Der weibliche Genitalapparat von *Oxymirus cursor L.* ist dadurch ausgezeichnet, daß er zwei stark entwickelte, zu Knäueln aufgerollte, pilzgefüllte Intersegmentalschläuche aufweist.

Symbionten. Die Symbionten von *Oxymirus cursor L.* sind verhaltnismäßig groß, keulenförmig, sehr langgestreckt und einseitig zugespitzt (Abb. 14). Die Zellen sind häufig etwas gebogen. Große: 7,5 bis 11,4 μ lang, 2,1 bis 2,9 μ breit, im Mittel 9,5 μ lang und 2,6 μ breit. Die Sprossung, die ziemlich selten ist, findet hier im Gegensatz zu den *Rhagium*-Symbionten stets am spitzen Pol der Zellen statt. Zelleinschlüsse sind im allgemeinen nicht vorhanden; nur selten kann man Hefen mit mehreren, schwer sichtbaren Vakuolen beobachten. Aus den Abbildungen bei *Buchner* geht hervor, daß die Pilze der intersegmentalen Organe genau dasselbe Aussehen haben, wie die der Blindsäcke.

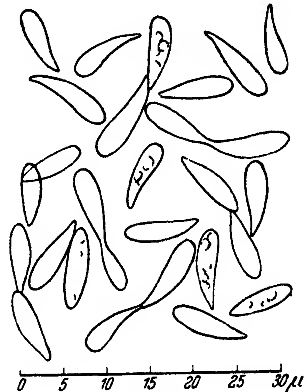


Abb. 14
Symbionten von *Oxymirus cursor* aus den Mycetocyten.

Kulturversuche. Die Pilze des Darmanhanges von *Oxymirus cursor L.* erwiesen sich als nicht kultivierbar trotz zahlreicher Versuche mit verschiedenem Material, das hier verhaltnismaßig reichlich zur Verfügung stand. In Wurze, auf Wurzegelatine und auf Würzeagar trat nie Wachstum ein. Versuche in Tröpfchenkulturen mit Würze, Most, Glucose-Alaninlösung schlugen ebenfalls fehl; nach 8 bis 10 Tagen war das Plasma der Zellen stark granuliert. Versuche, die Symbionten durch Einspritzen in die Lymphe von Raupen und Puppen zur Sprossung zu bringen, waren ergebnislos. Es wurden Aufschwemmungen der Symbionten in *Ringer*lösung injiziert, und auch ganze Gewebeteile mit Mycetocyten in die Tiere eingefuhrt. In den nach *Giemsa* gefärbten Ausstrichen zeigten die Zellen meist einen stark granulierten, kontrahierten Inhalt; nie war Sprossung eingetreten. Häufig konnte beobachtet werden, daß die injizierten Hefezellen restlos in Phagocyten aufgenommen wurden, in anderen Fallen enthielt die Lymphe noch nach 3 Tagen freie Symbionten.

e) Leptura rubra L.

Vorkommen. Die Larven von *Leptura rubra L.* leben in ähnlicher Weise wie *Oxymirus*-Larven im Innern von Nadelholzstümpfen.

Herkunft des Materials. Aus Fichte (Karlsruhe, Hardtwald).

Lokalisation der Symbionten. Die Darmblindsäcke der Larven wurden von *Heitz* entdeckt. Man findet fast am Beginn des Mitteldarmes etwa acht verhältnismäßig große blumenkohlähnliche Ausstülpungen mit meist stark besiedelten Mycetocyten.

Die Intersegmentalschlauche sind etwas größer als bei *Rhagium.*

Symbionten. Die Symbionten von *Leptura rubra L.* fallen durch ihre Größe auf. Sie sind keulenförmig, einseitig zugespitzt und deutlich gebogen (Abb. 15). Die Zellen sind 10,8 bis 18,0 μ lang, 2,5 bis 5,0 μ breit, im Mittel 14,0 μ lang und 3,9 μ breit. Meist sind im Innern eine bis mehrere große Vakuolen sichtbar. Die Sprossung erfolgt in ähnlicher Weise wie bei *Rhagium* am stumpfen Pol. Die jungen Zellen erreichen im Zusammenhang mit der Mutterzelle oft schon ihre endgültige Länge, sind aber noch wesentlich schlanker.

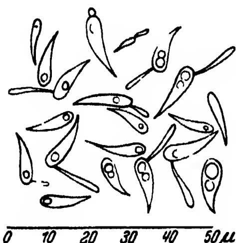


Abb 15.
Symbionten von *Leptura rubra* aus den Mycetocyten.

Heitz berichtet, daß die Hefen der Intersegmentalschläuche ähnlich gestaltet, doch etwas kleiner sind und die Neigung haben, schlauchartig auszuwachsen.

Kulturversuche. Die Kultur von *Leptura*-Symbionten ist schon *Heitz* (1927) gelungen. In meinen Versuchen wuchsen die Hefen, in Würze übertragen, leicht, doch nicht so kräftig wie die *Rhagium*-Symbionten. Bei 15° C setzte nach etwa 30 Stunden in den Tröpfchenkulturen das Wachstum ein. Die zunächst gebildeten Zellen glichen den Mutterzellen ziemlich genau; sie waren ebenfalls langgestreckt und

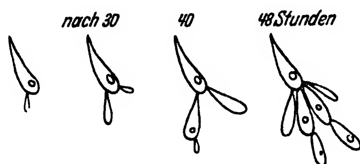


Abb. 16.
Vermehrung der Symbionten von *Leptura rubra* im Würzetropfen.

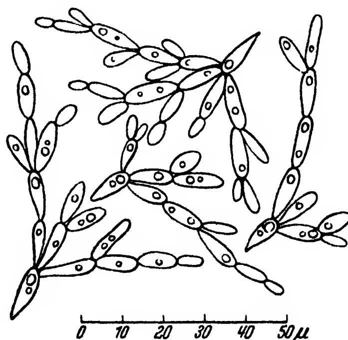


Abb. 17.
Symbionten von *Leptura rubra*, Kulturform in Würze, 4 Tage alt.

einseitig zugespitzt (Abb. 16). Die später entstandenen Zellen zeigten etwas verändertes Aussehen. Der spitze Pol war nicht mehr so deutlich ausgeprägt; die Zellen nahmen mehr länglich-ovale Form an. Doch

waren stets auch einige zugespitzte Formen zu finden. Die jungen Zellen blieben lange mit der Mutterzelle im Zusammenhang und bildeten große Sproßverbände (Abb. 17) von 100 bis 200 Zellen, bevor sich Zellpartien loslösten.

4. *Kulturversuche mit Siriciden-Symbionten.*

Sirex gigas L.

Vorkommen. *Sirex gigas* lebt in Nadelholz, in stehenden Stämmen, besonders wenn sie irgendeine Beschädigung (Schälwunde) aufweisen, ferner in gefällten Bäumen oder sogar in entrindetem Bauholz. Die Larve kommt also in lebendem saftreichen und in gesundem toten Holz, niemals aber in zersetztem Holz vor.

Nüsslin (1912) gibt die Generationsdauer der Wespe als mindestens zweijahrig an. Im Laboratorium ließen wir im Juli 1931 ein Weibchen von *S. phantoma* Eier in einem Fichtenknüppel von etwa 4 cm Durchmesser ablegen. Nach einem Jahr schlüpfte ein normal großes Männchen von 3 cm Lange aus. Das Holzstück stand die ganze Zeit in einem Glaskasten auf feuchtem Moos. Im Winter herrschte eine Durchschnittstemperatur von etwa 10 bis 12° C; es ist möglich, daß dadurch die Entwicklungsdauer abgekürzt wurde.

Herkunft des Materials. Imagines aus einem Neubau (Karlsruhe).

Lokalisation der Symbionten. Die Symbiose der *Siriciden* wurde von *Buchner* (1927) entdeckt. Es sind jedoch nur die Pilzspritzen der Weibchen bekannt, die sich als paarige Organe am Anfang des Legeapparates befinden. Durch entsprechende Muskelzüge wird beim Legeakt die Pilzmasse zusammen mit Drüsensekret ausgepreßt und gelangt so vermutlich mit den Eiern ins Holz. Über das weitere Schicksal der Pilze ist nichts bekannt.

Symbionten. Die Pilzspritzen enthalten oidienartige Mycelstücke, die im allgemeinen aus ein bis drei Zellen bestehen. Die häufig vorhandenen großen Schnallen lassen den Pilz als *Basidiomyceten* erkennen (Abb. 18). Nur selten sind die Mycelstücke verzweigt. Vakuolen und andere Zelleinschlüsse sind stets sichtbar. Bei meinem Material war ein Teil der Pilze abgestorben; sie zeigten stark granulierten Inhalt (Abb. 18). Größe: 30 bis 150 μ lang, 4,0 bis 5,2 μ breit, im Mittel 60 μ lang und 4,4 μ breit.

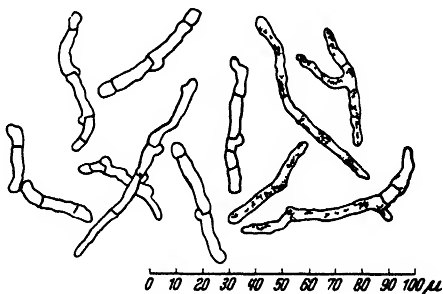


Abb. 18.
Symbionten von *Sirex gigas* aus den Übertragungseinrichtungen.

Kulturversuche. Der *Sirex*-Pilz ließ sich kultivieren. Das Wachstum war bei der ersten Isolierung langsam und unregelmäßig. In Großkulturen mit den gewöhnlichen Nährböden (Würze und Würzeagar) gewannen überall Bakterien, die vielleicht dem Spritzeninhalt bei-

gemengt sind, die Oberhand. In Tröpfchenkulturen mit Würze konnte schließlich Wachstum erzielt werden, von etwa 500 Oidien wuchsen jedoch nur zehn[1]. Das Auswachsen der Mycelstucke erfolgte stets an mehreren Stellen zugleich. Das neugebildete Mycelium trug zunachst keine Schnallen und hatte einen geringeren Durchmesser als die Oidien

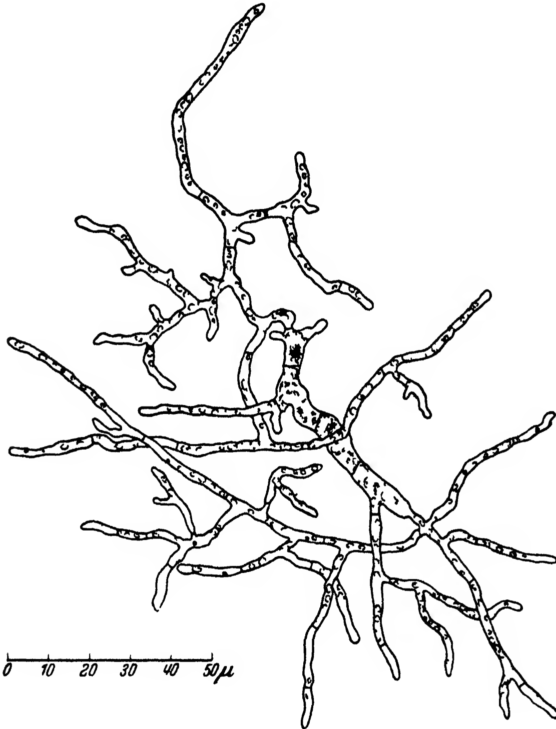


Abb. 19
Kleines Mycelium des *Sirex*-Pilzes, hervorgegangen aus einer Oidie, Tropfchenkultur in Würze nach 8 Tagen

(2,0 bis 2,5 μ). Es war reich verzweigt, besaß Querwande und oft viele große Vakuolen (Abb. 19). Die aus Tropfchenkulturen abgeimpften Mycelien wuchsen auf Wurzeagar gut weiter.

Ferner versuchte ich, den *Sirex*-Pilz auf Fichtenholz und Filtrierpapier zu zuchten, das zum Teil mit Wurze, zum Teil mit einer synthetischen Glucose-Nitratlosung mit geringem Milchsaurezusatz getränkt war. Als Impfmaterial diente eine Oidienaufschwemmung aus

[1] In einer Versuchsreihe von *Schwartz* war die Zahl der auswachsenden Oidien erheblich hoher.

den Pilzspritzen in *Ringer*lösung. Nur in den Kulturen mit Würzezusatz trat Wachstum ein (nach 5 Tagen). Der Organismus war der gleiche, der auch in den Tröpfchenkulturen gewachsen war.

5. *Zusammenfassung.*

Es gelang, die Symbionten von *Ernobius abietis Fbr.*, *Ernobius mollis L.*, *Rhagium bifasciatum Fbr.*, *inquisitor L.* und *mordax De G.*, *Leptura rubra L.* und *Sirex gigas L.* in Kultur zu nehmen. Bei *Ernobius mollis L.*, *Rhagium mordax De G.* und *Sirex gigas L.* ist die Kultur zum ersten Male gelungen. Die Symbionten der übrigen Arten (*Ernobius abietis Fbr.*, *Rhagium bifasciatum Fbr.*, *Rhagium inquisitor L.*, *Leptura rubra*) hat bereits *Heitz* (1927) kultiviert, dessen Ergebnisse im allgemeinen bestätigt werden konnten. Mit den angewandten Methoden nicht kultivierbar waren die Symbionten von *Xestobium rufovillosum De G.*, *Anobium striatum Oliv.*, *Dendrobium pertinax L.* und *Oxymirus cursor L.*

III. Eigenschaften der Symbionten in der Kultur.

1. *Herkunft der geprüften Stämme.*

Aus einer größeren Anzahl von isolierten Reinkulturen wurden für die eingehendere Untersuchung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften folgende Stämme ausgewählt:

Em 3 und *Em 6*:	*Ernobius mollis*, Fichte (Forstzoologisches Institut Hann. Münden).
Ea 1 und *Ea 3:*	*Ernobius abietis*, Fichtenzapfen (Lange Grinde, nördlicher Schwarzwald).
Rb 1:	*Rhagium bifasciatum*, Fichte (Herrenwieser See, nördlicher Schwarzwald).
Rb 2:	*Rhagium bifasciatum*, Fichte (Schliffkopf, nördlicher Schwarzwald).
Rb 3:	*Rhagium bifasciatum*, Fichte (Konigsfeld, mittlerer Schwarzwald).
Ri 1:	*Rhagium inquisitor*, Fichte (Strengen, Arlberg).
Lr 1:	*Leptura rubra*, Fichte (Karlsruhe, Hardtwald).
Sg 1:	*Sirex gigas*. Fichtenholz (Karlsruhe, aus einem Neubau).

Bei der Beschreibung der symbiontischen Hefen haben die Diagnosen bei *Stelling-Decker* (1931) als Vorbild gedient; sie wurden, der Fragestellung dieser Arbeit entsprechend, in einigen Punkten ergänzt.

2. *Morphologische Eigenschaften der isolierten Hefen.*

a) Kolonieform, Zellgestalt und vegetative Vermehrung.

Symbiont von Ernobius mollis. In Würze war nach 24 Stunden bei 25° C ein ganz schwacher Bodensatz entstanden; die Flüssigkeit blieb fast klar. Das mikroskopische Bild zeigte kugelrunde, oft zu umfangreichen Sproßverbänden zusammengelagerte Zellen mit starken

Größenunterschieden (Abb. 20). Zellgröße nach 7 Tagen: 1,8 bis 5 μ Durchmesser, im Mittel 3,4 μ. Nach 7 Tagen war schwache Gärung bemerkbar. Nach 14 Tagen hatte sich ein schwacher Hefering gebildet; die Zellform blieb unverändert.

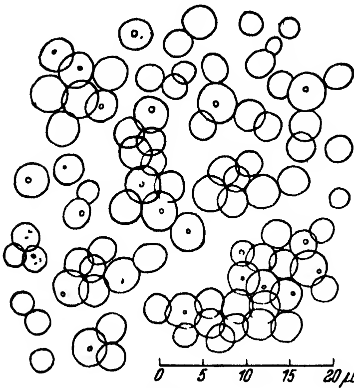


Abb. 20.
Hefe von *Ernobius mollis*,
Zellformen aus Würze nach 48 Std. (25° C).

Die Strichkulturen auf Würzeagar waren nach 4 Wochen bei 20° C gelblich-weiß, glatt, glänzend, mit wenig gebuchteten Rändern. Ihr Wachstum war schwach. Mikroskopisch bot sich dasselbe Bild wie in Würze, nur die großen Sproßverbände fehlten.

Die Riesenkolonie auf Würzeagar hatte nach 4 Wochen bei 20° C einen Durchmesser von 1,5 cm; sie war gelblich-weiß, glatt, glänzend, mäßig gewölbt, wenig gebuchtet und zeigte feine radiale Streifung.

In Fleischwasser trat kein Wachstum ein.

Injiziert in die Lymphe lebender Insekten, verhielten sich die *Em*-Stämme etwa wie eine gewöhnliche Kulturhefe, wie vergleichende Versuche mit *Saccharomyces ellipsoideus* zeigten. Das Wachstum war schwach und führte zur Bildung kleiner Sproßverbände.

Symbiont von Ernobius abietis. In Würze bei 25° C zeigten die *Ea*-Stämme nach 24 Stunden einen ganz schwachen, kaum sichtbaren

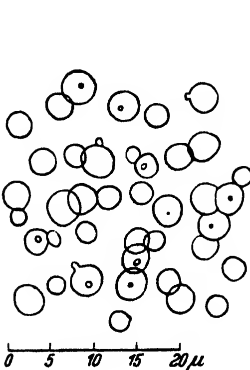


Abb. 21.
Hefe von *Ernobius abietis*,
Zellformen aus Würze nach 48 Std. (25° C).

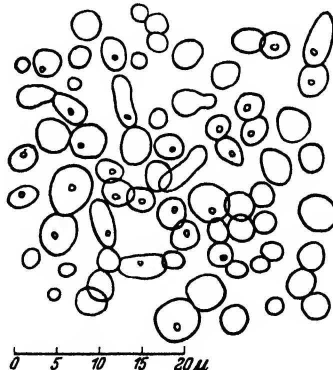


Abb. 22.
Hefe von *Ernobius abietis*,
Zellformen aus Würze nach 7 Tagen (25° C).

Bodensatz. Es fanden sich kugelige Zellen mit beträchtlichen Größenunterschieden, die kleine Sproßverbände bildeten (Abb. 21). Nach 7 Tagen fielen außerordentlich große Zellen auf, neben ganz winzigen Zellen (Abb. 22). Größe: 1,5 bis 6,5 μ Durchmesser, mit Mittel 3,4 μ.

Ferner wurden ab und zu langgestreckte, ovale bis zylinderförmige Zellen (3,4 × 7,5 μ) beobachtet. Gärung war kaum bemerkbar. Nach 3 Wochen hatte sich ein undeutlicher, gelblich-weißer Hefering gebildet.

Riesenkolonie und Würzeagarkultur hatten ein ähnliches Aussehen wie bei *Em*, nur war das Wachstum noch langsamer. Es verging etwa 1 Woche, bis im Schrägagarröhrchen der Impfstich sichtbar wurde.

Im Fleischwasser trat ebenfalls kein Wachstum ein.

Die Kultur in Lymphe zeigte gegenüber der *Em*-Hefe nichts Besonderes.

Formänderungen traten bei *Em*- und *Ea*-Stämmen weder in Lymphe noch in einem anderen Medium auf. Die Symbionten der beiden *Ernobius*-Arten bildeten in Kultur dieselben kugeligen Zellen wie in den Blindsäcken.

Symbiont von Rhagium bifasciatum. In Würze nach 48 Stunden bei 25° C schwache Gärung und Bodensatz; die Flüssigkeit zeigte leichte Trübung. Die Zellen waren oval, seltener kugelig und bildeten oft kleine Sproßverbände (vgl. Abb. 12). Nach 7tägigem Wachstum hatten sich ein starker, gelblicher Hefering, eine brüchige Haut und ein kräftiger, flockiger Bodensatz gebildet, der aus meist kugeligen, seltener ovalen Zellen mit beträchtlichen Größenunterschieden bestand (Abb. 23). Größe: 1,4 bis 4,7 μ lang, 1,4 bis 3,6 μ breit, im Mittel 3,2 μ lang und 2,8 μ breit. Die Zellen des Heferinges waren meist oval, seltener rund (Abb. 23), und im allgemeinen etwas kleiner; im Mittel 3,0 μ lang und 2,4 μ breit.

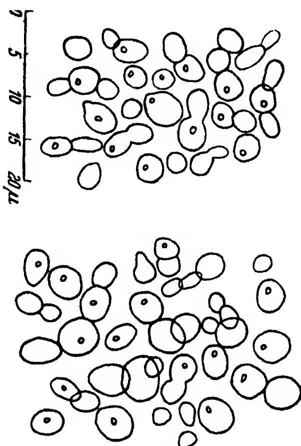


Abb. 23
Hefe von *Rhagium bifasciatum*, Zellformen aus Würze nach 7 Tagen (25° C). Oben Hefering-, unten Bodensatzformen.

Nach 14 Tagen hatte sich eine für die *Rb*-Hefen sehr charakteristische Änderung vollzogen. Oben im Hefering fand man jetzt auch tränenförmige Zellen, die etwas an die Hefen der Blindsäcke erinnerten.

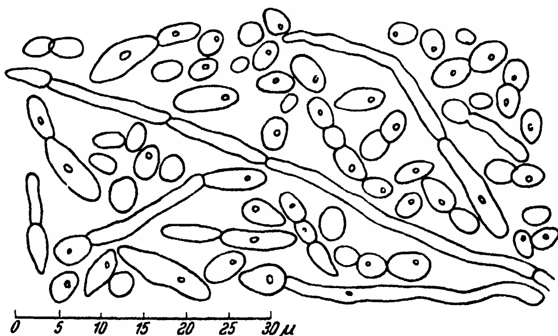


Abb. 24. Hefe von *Rhagium bifasciatum*, Zellformen aus Würze nach 14 Tagen (25° C).

Vornehmlich aus diesen, jedoch auch aus normalen, kugelig-ovalen Zellen waren durch Sprossung mehr oder weniger lange Schlauchzellen hervorgegangen. Diese Zellen bildeten durch mehrmalige Sprossung mitunter Ketten, so daß der Eindruck langer Faden entstand (Abb. 24). Daneben traten auch stark angeschwollene, zum Teil deformierte Zellen auf.

Strichkulturen auf Würzeagar wuchsen bei 20° C rasch, waren zuerst gelblich-weiß, spater gelblich und zeigten in den ersten Tagen nur normale kugelig-ovale Zellen. Anfangs hatten sie eine glatte, glänzende Oberflache und lappige Rander, die nach 8 bis 10 Tagen ein strahliges Aussehen bekamen, wie durch einen feinen Saum von Substratmycel. Unter dem Mikroskop fanden sich jetzt an den Rändern der Agarkulturen haufig kleine, dicht verschlungene Sproßmycelien von Schlauchzellen. Nach 3 bis 4 Wochen war die Mitte der Strichkultur stark faltig geworden.

Die Riesenkolonie erreichte auf Wurzeagar bei 20° C in 4 Wochen einen Durchmesser von 3 bis 3,5 cm. Sie war gelblich, glatt, glänzend, flach, in der Mitte punktiert und hatte stark gebuchtete Rander mit einem feinen strahligen Saum.

In Fleischwasser wuchs die *Rb*-Hefe gut. Nach 3 Tagen hatte sich bei 25° C ein Bodensatz, ein lockerer Hefering und eine bruchige Haut gebildet Haut und Ring sanken nach 8 bis 10 Tagen meist nieder. Im Hefering waren neben ovalen und runden, zahlreiche tranenformige Zellen zu sehen, die schon bei jungen Kulturen (3 bis 4 Tagen) zum Teil Schlauchzellen gebildet hatten. Das pastoriane Wachstum war fur die Fleischwasserkulturen besonders typisch Die Schlauchzellen bildeten oft reich verzweigte und zu Knaueln zusammengeballte Sproßmycelien (Abb. 25). Sanken die Schlauche in die Flussigkeit, so gingen kugelig-ovale Sproßkonidien aus ihnen hervor. Der Bodensatz in Fleischwasserkulturen bestand, ahnlich wie in Würze, vorwiegend aus kugeligen, seltener aus kugelig-ovalen Zellen.

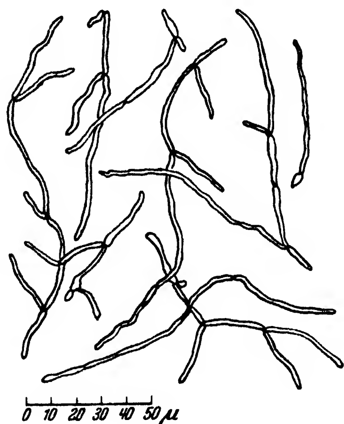


Abb. 25.
Rhagium bifasciatum-Hefe. Sproßmycelium aus Schlauchzellen, Kultur in Fleischwasser nach 14 Tagen (20° C).

Sehr uberraschend war das Ergebnis, als *Rb*-Hefe in Lymphe von lebenden Raupen und Puppen injiziert wurde. Die Hefe erwies sich als stark pathogen. Bei Injektion von etwa 0,3 ccm einer milchig truben Hefeaufschwemmung in *Ringer*losung, war schon nach 24 Stunden die ganze Lymphe mit reichlich sprossenden Zellen überschwemmt; nach 2 bis 3 Tagen gingen die Tiere in der Regel ein. Die Hefe zeigte in der

Lymphe anfangs die typische „Symbioseform", wie wir sie von den Blindsäcken her kennen: gestreckte, einseitig zugespitzte Zellen mit Sprossung am stumpfen Ende. Nach 3 Tagen waren außerdem zahlreiche Schlauchzellen entstanden. Die Hefe ließ sich aus der Lymphe rückisolieren; es entstand wieder die bekannte kugelig-ovale „Kulturform". Wurden Schlauchzellen aus Lymphe in Würze übertragen, so bildeten sie kugelig-ovale Sproßkonidien (Abb. 26).

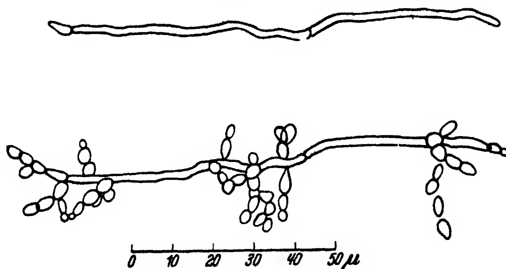


Abb. 26.
Symbionten von *Rhagium bifasciatum*.
Oben: Schlauchzellen aus Raupenlymphe.
Unten: Bildung von Sproßkonidien nach Übertragung in Würze.

Symbionten von Leptura rubra. Ältere Würze-, Würzeagar- und Würzegelatine-Kulturen bestanden vorwiegend aus runden bis breitovalen Zellen, während die anfänglich vorhandenen langgestreckten Zellen (vgl. Abb. 17) von 10 bis 20 μ Länge und 2,8 bis 4,6 μ Breite (im Mittel 14,6 : 3,6 μ) zurücktraten. Die Kolonien hatten eine gelblichweiße (Würzegelatine) bis grauweiße (Würzeagar) matte Oberfläche und schwach gelappten Rand. In Würze entwickelte sich langsam ein Bodensatz.

b) Sporenbildung.

Heitz ist es bei den Symbionten von *Ernobius abietis* und *Rhagium bifasciatum* nicht gelungen, Sporenbildung zu erzielen. Auch meine Versuche verliefen bei allen Stämmen negativ. Ich prüfte auf Sporen bei 15 und 25° C in Gipsblockkulturen mit Wasser und nach den Angaben von *Stelling-Decker* auch mit Nährlösung (2% Mannit und 0,25% Dikaliumphosphat), ferner in Karotten- und Kartoffelkulturen. Auch die Heferinge und Würzeagarkulturen enthielten keine Sporen.

3. Physiologische Eigenschaften der isolierten Hefen.

a) Gärvermogen.

Stelling-Decker (1931) schlug vor, die Prüfung des Gärvermögens in Einhornröhrchen vorzunehmen, da diese Methode die zuverlässigsten Ergebnisse liefert. Ich verwendete die *Lindner*sche Kleingärmethode, die, wenn man durch Kontrollversuche Täuschungen ausschließt, ebenso geeignet ist und den Vorteil hat, daß man mit sehr kleinen Hefemengen arbeiten kann. Zur Prüfung der verschiedenen Kohlenhydrate wurden 2%ige Lösungen in Hefewasser verwendet.

Die beiden *Ernobius*-Hefen und die *Leptura*-Hefe vergären nur die drei Monosen: Glucose, Mannose und Lävulose, während die Hefe von *Rhagium bifasciatum* die Monosen einschließlich Galactose und dazu noch Saccharose und Raffinose (nur schwach) vergärt (Tabelle I).

Tabelle I.
Gärvermögen in Hefewasser-Zuckerlösung nach 48 Stunden.

	Ernobius mollis	*Ernobius abietis*	*Rhagium bifasciatum*	*Rhagium inquisitor*	*Leptura rubra*
Glucose	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Lävulose	+	+	+	+	+
Galactose	0	0	+	+	0
Saccharose	0	0	+	+	0
Maltose	0	0	0	0	0
Lactose	0	0	0	0	0
Raffinose	0	0	+	+	0

Außerdem wurden noch geprüft: Arabinose, Mannit, Glycerin, Dextrin, Stärke, Glykogen; nirgends trat Gärung auf.

b) Kohlenstoff- und Stickstoffquellen.

Um zu prüfen, inwieweit die verschiedenen *Kohlenstoffquellen* als Nährstoffe für die Hefen in Frage kommen, benutzte ich als Nährböden Hefewasser (1 : 1 mit Wasser verdünnt), dem 13 % Gelatine und 2 % der betreffenden Kohlenstoffquelle zugesetzt waren. Den Nährboden ließ ich in Röhrchen schräg erstarren und impfte als Strichkultur. Als Kontrolle diente Hefewassergelatine ohne Zusatz.

In Tabelle II fällt zunächst das erheblich schlechtere Wachstum der *Ernobius*- und *Leptura*-Hefen gegenüber den *Rhagium*-Hefen auf. Für die *Rhagium*-Hefen waren die Mono- und Disaccharide mit Ausnahme von Lactose, dazu noch Mannit und Glycerin, recht gut verwertbar, Raffinose und Arabinose und besonders die Polysaccharide dagegen schlechter. Für die beiden *Ernobius*-Hefen waren ziemlich übereinstimmend die Monosaccharide neben Mannit und Glycerin als C-Quellen am besten geeignet, die übrigen Stoffe dagegen in viel geringerem Grade; gänzlich ungeeignet schien Lactose zu sein. Mikroskopisch zeigten sich in keiner Kultur irgendwelche Besonderheiten.

Wesentlich schwieriger war die Prüfung der *Stickstoffquellen*, da in synthetischen Nährmedien die *Rhagium*-Hefen ein verhältnismäßig schlechtes, die *Ernobius*-Hefen aber so gut wie kein Wachstum zeigten. Das Nährsubstrat bestand aus Phosphatpufferlösung nach *Sörensen* ($p_H = 6{,}4$), 1 : 1 mit Leitungswasser verdünnt[1], 2 % Glucose, 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ und jeweils 0,1 % der als N-Quelle dienenden Substanz.

[1] Die Phosphatkonzentration betrug $^1/_{30}$ mol. im Liter.

Tabelle II.

Verwertbarkeit verschiedener C-Quellen als Zusatz zu Hefewassergelatine.

Die Kreuze geben die Stärke des Wachstums nach 14 Tagen bei 25° C an. v und (v) bedeuten, daß die Gelatine stärker oder schwächer verflüssigt wurde.

	Symbionten von				
	Ernobius mollis	*Ernobius abietis*	*Rhagium bifasciatum*	*Rhagium inquisitor*	*Leptura rubra*
Glucose . . .	+++ v	++	+++++v	+++++v	+++
Mannose . . .	+++	++	+++++v	+++++v	+++
Lävulose . . .	+++ (v)	++	+++++v	+++++v	+++
Galactose . .	++ v	++ v	++++ v	++++ v	++
Saccharose . .	++ (v)	+	+++++v	++++ v	++
Maltose . . .	++ (v)	+	+++++v	++++ v	++
Lactose . . .	(+) v	(+) (v)	++ (v)	++ (v)	+
Raffinose . . .	++	+	+++	+++ v	++
Arabinose . .	++ (v)	+	+++	++ v	++
Mannit . .	+++	++	++++(v)	++++ v	+++
Glycerin . . .	+++ (v)	++	++++(v)	++++ v	+++
Dextrin . . .	++ (v)	+	++	+++ v	++
Stärke	++	+	++	++ v	++
Glykogen . .	++	+	++	++ v	++
Kontrolle . .	(+)	0—+	(+)	(+) (v)	(+)

Für die *Rhagium*-Hefen waren Ammonsalze, Pepton und Harnstoff gute N-Quellen, Aminosäuren waren etwas weniger günstig, Hippursäure und besonders Albumin ließen nur geringes Wachstum zu. Kaliumnitrat kam als N-Quelle überhaupt nicht in Frage (vgl. Tabelle III). Leider sind die *Ernobius*-Hefen bei diesem Versuch nicht gewachsen. Nach 4 Wochen zeigten die Kulturen nur ganz minimale Entwicklung. Vielleicht waren die Ammonsulfat- und Peptonkulturen etwas besser. Die

Tabelle III.

Verwertbarkeit verschiedener N-Quellen als Zusätze zu synthetischen Nährsubstraten für die Symbionten von Rhagium bifasciatum.

Die Kreuze geben die Stärke des Wachstums nach 3 Wochen bei 25° C an.

	Wachstum	
	in Nährlösung	auf Agar
Ammonsulfat	++++	++++
Kaliumnitrat	0	0—+
Ammonsuccinat	++++	++++
Alanin	+++	++++
Tyrosin	++	+++
Pepton	++++	++++
Albumin	0—+	+
Harnstoff	++++	++++
Hippursäure	++	++
Kontrolle	0	0—+

Lr-Hefe verhielt sich ähnlich. Ich habe versucht, durch geringe Zusätze von Hefewasser das Wachstum der *Ernobius*-Hefen zu steigern. Die Kulturen entwickelten sich jetzt allgemein etwas besser, doch war kein Unterschied zwischen den verschiedenen N-Quellen und der Kontrolle bemerkbar.

Da *Buchner* vermutet, daß die Symbionten bei der *Cellulose-verdauung* eine Rolle spielen, versuchte ich die Hefen auf Cellulose-nährböden zu züchten. Auf Filtrierpapierschnitzeln, mit anorganischer Nährlösung[1] getränkt, trat nie Wachstum ein; wurde statt Nährlösung Würze verwendet, so wuchsen die Hefen zwar üppig, doch die Cellulose wurde in keiner Weise angegriffen.

In anaeroben Filtrierpapierkulturen mit anorganischer Nährlösung oder Hefewasser (Einschlußpräparate und Röhrchen mit Paraffinöl überschichtet) war ebenfalls keine Cellulosezerstörung bemerkbar.

Auf synthetischem Agar[2] mit Xylan aus Weizenstroh als C-Quelle trat ebenfalls nie nennenswertes Wachstum ein.

Auch *Heitz* gelang es nicht, Cellulosezersetzung in seinen Kulturen nachzuweisen.

Alle Stämme, außer der *Lr*-Hefe, bildeten *proteolytisches Ferment*. Auf Würzegelatine verflüssigten die *Rhagium*-Hefen nach 3 bis 4 Tagen schon sehr stark, die *Ernobius*-Hefen haben dagegen ein viel geringeres Verflüssigungsvermögen.

c) Stickstoffbindung.

Buchner und *Heitz* halten es für möglich, daß die symbiontischen Hefen die Fähigkeit besitzen, Luftstickstoff zu assimilieren. *Heitz* stützte seine Vermutungen auf einen Bericht von *Zikes* (1919) über eine stickstoffbindende *Torula*-Art; allerdings ist dieser Befund bisher nicht bestätigt worden.

Obwohl bei dem schlechten Wachstum meiner Hefestämme in synthetischen Nährlösungen ein positives Ergebnis wenig wahrscheinlich war, wurden doch, um ganz sicher zu gehen, einige N-Bindungsversuche nach der Methode von *Schober* (1930) und *Schröder* (1932) gemacht. Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: vierfach destilliertes Wasser 100 ccm, K_2HPO_4 0,1 g, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,02 g, $FeCl_3$ 0,002 g, Glucose 5 g. Die Versuche wurden in 250-ccm-Kolben aus Jenaer Glas, die nach der Vorschrift von *Schober* vorbehandelt waren, mit je 100 ccm Nährlösung angesetzt. Ich impfte mit einer Platinöse einer jungen Würzeagarkultur. Die Kolben standen bei 25° C im Thermostaten und wurden täglich 1 Stunde mittels der von *Schober* beschriebenen Durchlüftungseinrichtung mit NH_3-freier Luft gelüftet.

[1] Phosphatpuffer nach *Sörensen* ($p_H = 6,4$), 1 : 1 mit Leitungswasser verdünnt mit Zusatz von 0,05% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ und 0,1% $(NH_4)_2SO_4$. — [2] Hergestellt durch Zusatz von 1% Xylan und 1,5% Agar zur synthetischen Nährlösung (s. Fußnote 1).

Sichtbares Wachstum war nirgends eingetreten, ebensowenig eine Zunahme des N-Gehaltes der Lösung. Nach 6 und 12 Wochen bestimmte ich nach der *Pregl*schen Mikro-*Kjeldahl*-Methode den Stickstoffgehalt der Kulturen, und zwar einmal im klaren Filtrat und dann in der Lösung nach Umschütteln, wodurch die abgesetzte Impfhefe aufgeschwemmt wurde (Tabelle IV). Der negative Ausfall dieser Versuche läßt die Möglichkeit offen, daß die Symbionten in künstlicher Kultur vielleicht ihr Stickstoffbindungsvermögen verloren haben. Dem wäre entgegenzuhalten, daß die stickstoffbindende *Torula* von *Zikes* sehr wohl in synthetischer Nährlösung Luftstickstoff assimilieren konnte. Dagegen ist es bis jetzt nicht einwandfrei gelungen, an Reinkulturen der *Knöllchenbakterien* der Leguminosen N-Bindung nachzuweisen.

Tabelle IV. N-Bindungsversuch mit symbiontischen Hefen. Die Zahlen bedeuten mg N in 100 ccm Flüssigkeit.

	Kontrolle N-Gehalt bei Versuchsbeginn	N-Gehalt nach 6 Wochen bei		
		Em 3	*Ea 1*	*Rb 1*
Filtrat	0,332	0,375	0,375	0,400
Lösung nach Umschütteln	0,487	0,510	0,465	0,530

d) Die Fermente der symbiontischen Hefen.

Die Ernährungs- und Gärversuche haben schon einen Einblick in die fermentativen Eigenschaften der Hefen gewährt; die Ergebnisse sollten nochmals mit einer anderen Methode geprüft werden. Mit einem *Rhagium*- und einem *Ernobius*-Stamm (*Rb 1* und *Em 3*) wurden einige Versuche zur Feststellung der wichtigsten Fermente der Reinkulturen nach der im Abschnitt V angegebenen Methode angeführt. *Schwartz* (1924) hat sich fermenthaltige Lösungen dadurch hergestellt, daß er seine *Lecaniinen*-Symbionten in synthetischer Nährlösung zog; er konnte dann das Filtrat der Kulturen an Stelle von Fermentextrakten verwenden. Da meine Hefen in synthetischen Lösungen zu schlecht wuchsen, zog ich sie 14 Tage bis 3 Wochen in Kölbchen auf Würzeagar, bis eine ziemlich dichte Hefeschicht entstanden war; dann spülte ich diese mit destilliertem Wasser ab, fügte etwas Thymol zu und ließ 24 Stunden stehen. Nach Zentrifugieren war der Fermentextrakt gebrauchsfertig.

Bei der *Rhagium*-Hefe fanden sich eine kräftige Invertase, ferner Emulsin und eine schwache Amylase. Maltase, Lactase, Cellulase und Xylanase waren nicht vorhanden. Die *Ernobius mollis*-Hefe hatte außer einer sehr schwachen Amylase keine von den Carbohydrasen, auf die geprüft wurde. Lipase war nicht nachweisbar. Von einer besonderen Prüfung auf Proteasen wurde abgesehen.

4. Morphologische und physiologische Eigenschaften des Sirex-Pilzes.

Der *Sirex*-Pilz zeigt auf allen Substraten das bei *Hymenomyceten* häufige langsame Wachstum. Auf Würzeagar bildete er zunächst ein

grau-weißes, lockeres Luftmycel; nach 8 bis 10 Tagen war dann eine niedere, weiße, fest verfilzte Myceldecke entstanden, die sich nach 4 bis 6 Wochen bräunlich grau verfärbte. Sie bestand aus einem dichten Geflecht geweihartig verzweigter Hyphen mit großen Schnallen (Abb. 27). Das Mycel hatte starke Ähnlichkeit mit den Pilzen aus den Übertragungsorganen, nur fehlte der oidienartige Zerfall. In Würze bildeten sich große wattige Mycelflocken von reich verzweigten, gestreckten, ebenfalls Schnallen tragenden Hyphen (Abb. 28); in 8 bis 10 Tagen entstand eine geschlossene Myceldecke auf der Nährlösung. Oidienbildung wurde weder in Flüssigkeitskulturen oder auf festen Nährböden noch im Einschlußpräparat mit gepufferter Würze von verschiedenem p_H beobachtet.

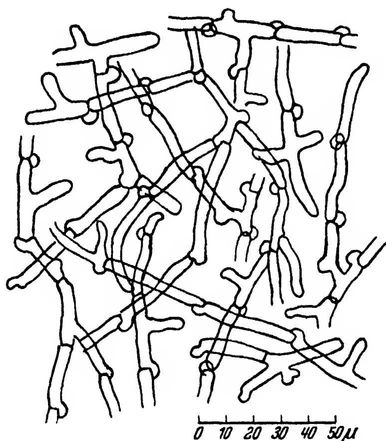


Abb. 27
Symbiont von *Sirex gigas*. Kultur auf Würze-Agar. Hyphen aus der Myceldecke nach 14 tägiger Kultur bei 20° C.

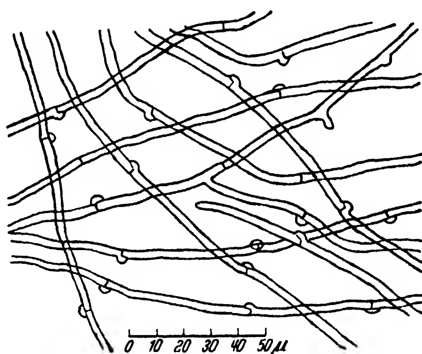


Abb. 28.
Symbiont von *Sirex gigas*. Untergetauchte Hyphen aus Würzekultur nach 8 Tagen bei 20° C.

Die Ernährungsversuche zeigten, daß der *Sirex*-Pilz ein recht anspruchsvoller Organismus ist. Auf synthetischen Substraten wuchs er schlecht. In Glucoselösung mit den üblichen Salzen und Ammonsulfat oder Aminosäuren als N-Quelle wurden höchstens kleine Mycelinselchen gebildet. In Hefewasser mit Zusätzen von verschiedenen Kohlenstoffquellen war das Wachstum bei Glucose, Dextrin, Mannit, Glycerin kräftig wie in Würze, bei Kaliumbitartrat und Natriumsuccinat schlecht und unterblieb bei neutralem Natriumcitrat ganz. Durch Asparagin und Hippursäure ließ sich das Wachstum in verdünnter Würze (spez. Gew. 1,01) etwas steigern.

Auf Fichtenholz[1], das mit mineralischer Nährlösung[2] mit oder ohne Glucosezusatz getränkt war, trat kaum nennenswertes Wachstum

[1] Von *Sirex* befallenes Fichtenholz. — [2] Phosphatpuffer nach *Sörensen* (p_H = 6,4), 1 : 1 mit Leitungswasser verdünnt, mit Zusatz von 0,05% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ und 0,1% $(NH_4)_2SO_4$.

ein. Es kam in 4 Wochen höchstens zu einem spärlichen, flaumigen Anflug, während bei Würzezusatz sich die Holzstücke nach 8 bis 10 Tagen mit einem strahligen grauen Mycel, später mit einem dichten, weißen Filz überzogen, doch waren selbst nach mehreren Monaten am Holz selbst keinerlei Zersetzungserscheinungen zu bemerken.

Ferner versuchte ich, den *Sirex*-Pilz in frischem Holz zu züchten. Ich bohrte in Prügel der Weißtanne von 5 cm Durchmesser und etwa 40 cm Länge 4 mm weite und 35 bis 40 mm tiefe Löcher, in die ich etwas Mycel einimpfte. Die Bohrlöcher wurden mit kleinen Korken verschlossen, nachdem ich etwas steriles Wasser zugegeben und in einigen Fällen die Löcher mit Bohrspänen wieder zugestopft hatte. Die Holzstücke standen in einem Glasgefäß mit etwas Wasser. Obgleich hier für den *Sirex*-Pilz ähnliche Verhältnisse gegeben waren wie an seinem von *Buchner* vermuteten natürlichen Standort, erfolgte innerhalb von 8 bis 14 Tagen in keinem Falle Wachstum. In einigen Löchern traten spärliche Mycelfäden auf, die jedoch, wie das mikroskopische Bild und Rückisolierungsversuche zeigten, mit dem symbiontischen Pilz nicht identisch waren.

Auf reiner Cellulose (Filtrierpapier), die mit anorganischer, N-freier oder N-haltiger Nährlösung getränkt war, wuchs der Pilz überhaupt nicht. Anaerobe Kulturen brachten ebenfalls keinen Erfolg. Der *Sirex*-Pilz vermochte also Cellulose nicht anzugreifen. Das spärliche Wachstum auf Holz ist wohl auf Spuren von Zucker, Proteinen und ähnlichen Stoffen zurückzuführen. In Holzextrakt konnte der Symbiont nur Mycelflocken, aber keine Decke bilden.

5. *Systematische Stellung der Symbionten.*

Bisher wurden die Symbionten der *Anobiiden* und *Cerambyciden* von *Buchner* (1930) als „*Saccharomyceten*" bezeichnet; *Heitz* spricht von „*Hefen*". Das einzige über die systematische Stellung entscheidende Merkmal wäre die Sporenbildung, die bei den *Rhagium*-, *Leptura*- und *Ernobius*-Hefen fehlte. Da die Symbiose aber keineswegs mit der Unterdrückung der Sporenbildung verbunden sein muß (*Spondylis*, *Tetropium*), ist die Asporogenität bei den untersuchten Arten auffällig und nicht ohne weiteres als Folgeerscheinung der symbiontischen Lebensweise aufzufassen.

Zur Bildung von echten Mycelien und typischen Dauerzellen kam es bei keinem der geprüften Stämme. Höchstens traten bei der *Rb*-Hefe in älteren Kulturen lange, schlauchförmige Zellen auf. Schlauchzellenbildung kommt bei echten Hefen auch vor: *Hansen* hat bei *Saccharomyces validus* in älteren Kulturen reich verzweigte Sproßmycelien aus langgestreckten, fadenförmigen Zellen beobachtet (vgl. *Stelling-Decker*, 1931).

Da Sporen und echte Mycelien fehlen, müssen wir vorerst für die *Rhagium*-, *Leptura*- und *Ernobius*-Hefen die Bezeichnung „*Pseudosaccharomyceten*“ anwenden. Bei Berücksichtigung des Gärvermögens wären die *Rhagium*-Hefen mit der Untergruppe *b*, die *Ernobius*-Hefen und die *Leptura*-Hefe mit der Untergruppe *d* der echten *Saccharomyceten* vergleichbar (*Klöcker* 1924).

Der *Sirex*-Pilz hat bis jetzt in den Kulturen keine Fruchtkörper gebildet; daher ist eine nähere Bestimmung nicht möglich.

6. *Zusammenfassung.*

Die *Ernobius*-Symbionten zeigten in allen Medien stets die gleiche Gestalt. Auch die *Leptura*-Hefe behielt in Kultur bis zu einem gewissen Grade ihre Gestalt bei. Die Zahl der kugeligen und ovalen Zellen war gering. Die Symbionten der *Rhagium*-Arten veränderten sich dagegen stark. Die Symbioseform bestand in der Hauptsache aus langgestreckten, einseitig zugespitzten Zellen, die Kulturform in Würze aus kugelig-ovalen Zellen. Nach Injektion in Insektenlymphe entstanden wieder die Zellgestalten der Symbioseform. Pastoriane Formen fehlten in den Mycetocyten, traten jedoch in Würzekulturen und Lymphe auf. Sproßverbände bildete nur die Kulturform. Tabelle V gibt eine Übersicht über diese Verhältnisse.

Tabelle V.

Wuchsformen der Symbionten in verschiedenen Medien.

Symbionten von	Wachstum		
	in den Mycetocyten	in Würze	in Lymphe lebender Insekten
Ernobius mollis	kugelige Zellen	kugelige Zellen, große Sproßverbände	kugelige Zellen, kleine Sproßverbände
Ernobius abietis	kugelige Zellen	kugelige, selten langliche Zellen, kleine Sproßverbande	kugelige Zellen, kleine Sproßverbande
Rhagium bifasciatum und *Rh inquisitor*	langgestreckte, einseitig zugespitzte Zellen	kugelig-ovale Zellen, Schlauchzellen, kleine Sproßverbände	langgestreckte, einseitig zugespitzte Zellen, Schlauchzellen
Leptura rubra	keulenformige, einseitig zugespitzte Zellen	langgestreckte, zum Teil einseitig zugespitzte Zellen, sehr große Sproßverbände	—

Die physiologische Prüfung der isolierten Hefen ergab keine Anhaltspunkte für Eigenschaften, die für das Leben der Wirtstiere von

Bedeutung sein könnten. Celluloseabbau konnte weder in Ferment- noch in Wachstumsversuchen festgestellt werden. Auch die Vermutung von *Heitz*, daß N-Bindung vorliegen könnte, konnte analytisch nicht erwiesen werden.

Im allgemeinen waren die symbiontischen Hefen ziemlich anspruchsvolle und schlecht wüchsige Organismen; ihre „Vitalität" war, besonders bei den *Ernobius*- und *Leptura*-Hefen, wesentlich geringer als bei den Kulturhefen. Da Sporen, aber auch echte Mycelien und Dauerzellen nicht beobachtet wurden, sind die geprüften Organismen vorerst zu den *Pseudosaccharomyceten* zu stellen.

Der *Sirex*-Pilz war unbestimmbar, da er bisher in Kultur keine Fruchtkörper gebildet hat. In ernährungsphysiologischer Hinsicht erwies sich der Pilz als ein ziemlich anspruchsvoller Organismus, der auf reiner Cellulose überhaupt nicht und auf Holz ohne Zusätze nur sehr schwach wuchs.

IV. Untersuchung der Pilzvegetation des Darminhaltes und der Fraßgänge.

1. *Methode.*

Unter sterilen Bedingungen herauspräparierte Därme oder Darmteile wurden mit einem Glasstab in Röhrchen mit verflüssigten Nährböden verrieben und durch Umschütteln gut verteilt. Von diesen Röhrchen stellte ich zwei bis drei Verdünnungskulturen in *Petri*-Schalen her. In gleicher Weise untersuchte ich auch die Außenflora der Larven und die Flora der Fraßgänge. Die Larven wurden möglichst einem bis dahin ungeöffneten Gang entnommen, um Luftinfektionen zu vermeiden. Dann spülte ich die Keime von der Körperoberfläche der Larven ab, indem ich die Tiere in verflüssigtem Nährboden kraftig umschwenkte; nach Entfernung der Larven verwendete ich die Röhrchen zu Verdünnungskulturen. Zur Feststellung der Vegetation der Fraßgänge diente etwas Fraßmehl aus einem frisch geöffneten Gang als Impfmaterial.

Da sich die Versuche nur auf die Pilzflora erstrecken sollten, dienten Würzeagar oder Würzegelatine als Nährböden. Folgende symbiontenführende Arten wurden untersucht: *Ernobius abietis, Ernobius mollis, Anobium striatum, Rhagium*-Arten, *Oxymirus cursor* und *Leptura rubra*; ferner zwei Arten ohne Symbiose: *Cerambyx cerdo* und *Gracilia minuta.*

Für eine Prüfung der *Siriciden* reichte das Material nicht aus.

2. *Versuchsergebnisse.*

Nach ihrer Darm- und Fraßgangflora kann man die untersuchten Arten in zwei Gruppen trennen. Gruppe I umfaßt alle Arten mit trockenen Nährsubstraten, während die Formen der Gruppe II an verhältnismäßig feuchten Orten leben. Zur Gruppe I gehören alle untersuchten *Anobiiden* und die in Weidenkörben lebende *Gracilia minuta.* Alle übrigen Arten sind zur Gruppe II zu stellen.

Die Darm- und Fraßgangflora der Gruppe I bestand lediglich aus verschiedenen grünen, zum Teil Coremien bildenden *Penicillium*-Arten

(Tabelle VI) In einigen Fällen traten noch wenige *Hefe*-artige Organismen dazu, jedoch nur in der Darmflora; im Fraßgang waren sie nicht zu finden. In den Gängen von *Ernobius abietis* stellte ich einmal eine *Ceratostomella*-Art fest.

Ein etwas reichhaltigeres Bild bot die Gruppe II (Tabelle VI). *Hefen* bildeten hier meist den Hauptanteil an der Darm- und Fraßgangflora. In manchen Fällen überwogen die auch hier meist reichlich vorhandenen *Penicillium*-Arten. Auch Angehörige der Gattungen *Mucor* und *Verticillium* waren ziemlich regelmäßig, doch nur spärlich zu finden. Selten traten auf: *Schwärzepilze*, *Botrytis*, *Ceratostomella*-Arten und unbestimmbare *Basidiomyceten*-Mycelien. Die Vegetation der Fraßgänge zeigte eine ganz ähnliche Zusammensetzung.

Tabelle VI.

Pilzvegetation des Darminhaltes von Anobiiden und Cerambyciden.

Die Zeichen ++, + und (+) geben an, ob die Pilze vorwiegend, häufig oder vereinzelt vorkommen.

Gruppe	Larven von	*Hefen*	*Penicillium*	*Verticillium*	*Mucorineen*	*Schwärzepilze*	*Sonstige Pilze*
I	*Ernobius abietis*	+	++	—	—	—	—
	" *mollis*	+	++	—	—	—	—
	Anobium striatum	+ *	++	-	—	—	—
	Gracilia minuta	—	+	—	—	—	-
II	*Rhagium bifasciatum*	+	++	(+)	-	—	(+)
		++	+	—	—	—	(+)
		++	+	(+)	(+)	-	—
		++	+	—	—	(+)	(+)
		++	+	-	(+)	—	—
	" *mordax*	+	++	—	—	(+)	(+)
	" *inquisitor*	++	(+)	—	(+)	-	—
	Orymirus cursor	+	+	++	—	—	(+)
		++	(+)	+	—	—	(+)
		++	+	—	(+)	(+)	—
		+	(+)	++	(+)	(+)	—
	Leptura rubra	++	+	—	—	-	(+)
		+	++	—	(+)	—	—
	Cerambyx cerdo	++	+	—	(+)	—	(+)

* Mycelhefe

Die Versuche ergaben eine auffallende Eintönigkeit in der Pilzvegetation, besonders beim Vergleich mit den Befunden von *Grossmann* (1931) über die Gangflora der rindenbrütenden Borkenkäfer, wo sich neben Hefen und gewöhnlichen *Schimmelpilzen* eine reiche Vegetation von *Blaufäulepilzen* vorfand. Beim Aufschlagen von Baumstümpfen kann man in den Gängen der *Cerambyciden* mitunter Konidienrasen von *Penicillium* und *Verticillium* sehen. Auch *Falk* (1930) berichtet,

daß er in den Gängen des in trockenem Bauholz lebenden Hausbockes, *Hylotrupes bajulus*, nur *Penicillium* fand.

Cellulosespaltende Bakterien ließen sich mit den üblichen Methoden (*Werner* 1926) weder im Darminhalt noch im Fraßmehl von *Oxymirus cursor* nachweisen.

Wesentliche jahreszeitliche Schwankungen in der Darm- und Fraßgangvegetation habe ich nicht festgestellt. Höchstens waren im Winter die *Hefen* gegenüber den *Schimmelpilzen* etwas häufiger.

Bei den Versuchen wurde besonders darauf geachtet, ob in Verdünnungskulturen die *symbiontischen Hefen* auftraten. Tatsächlich gelang in der Darmflora der Gattungen *Ernobius, Leptura* und *Rhagium* der Nachweis der Symbionten.

Bei *Ernobius abietis* und *mollis* traten im Darminhalt kugelige, *Torula*-ähnliche *Hefen* auf, die mit dem aus den Blindsäcken gezüchteten identisch waren. Andere Hefen fehlten. Im Fraßgang waren die Symbionten allerdings nicht auffindbar. *Anobium striatum*, dessen Symbiont nicht kultivierbar war, hatte nur eine *Mycelhefe* im Darm, wahrend bei der ebenfalls zur Gruppe I gehorigen *Gracilia* nur *Penicillien* auftraten. Auch *Heitz* konnte aus dem Darminhalt von *Ernobius abietis*, besonders von Hungertieren, die Symbionten züchten.

Bei den *Rhagium*-Arten (*Rhagium bifasciatum, inquisitor* und *mordax*), wurden im Darm ebenfalls die Symbionten gefunden. Sie waren leicht zu erkennen an ihrer Fahigkeit zur Schlauchzellenbildung; auch die übrigen Merkmale stimmen mit der Kulturform der *Rhagium*-Hefe uberein. Auch bei *Leptura* traf ich die Symbionten unter der Darmflora. In vielen Fallen waren nur die Symbionten vorhanden andere *Hefen* fehlten oder traten ganz zurück. Im Darm von *Oxymirus cursor* fand ich reichlich *Hefen* verschiedener Art, ebenso bei *Cerambyx cerdo.* In den meisten Fallen, in denen Symbionten sich im Darm nachweisen ließen, waren sie auch in der Außenflora der Larven und in den Fraßgängen reichlich vorhanden.

Durch die Untersuchungen von *Buchner* und *Heitz* wissen wir, daß aus den Mycetocyten regelmaßig Plasmaklumpen mit Symbionten ausgestoßen werden. Diese Erscheinung war auch an meinen Präparaten zu sehen. Im Lumen der Blindsacke sind mitunter reichlich Symbionten zu finden, die von da aus in den Darm gelangen. Tatsächlich konnte ich mikroskopisch im Darminhalt sämtlicher untersuchter Symbiontenträger mehr oder weniger reichlich Symbiontenzellen feststellen. Die *Hefen* werden wohl mit dem Kot ausgestoßen und gelangen so in die Fraßgänge.

Für die anderen nicht mit Symbionten identischen *Hefen* des Darminhaltes müssen wir annehmen, daß sie mit der Nahrung auf-

genommen werden. Dies gilt besonders für *Cerambyx cerdo* und *Oxymirus cursor*. Bei *Oxymirus* sah ich im Darminhalt die Symbionten sehr häufig; da sie jedoch bis jetzt nicht kultivierbar sind, waren sie in den Verdünnungskulturen von Darminhalt und Fraßmehl nicht wieder zu finden.

Da in morscher Rinde, alten Baumstümpfen, faulendem Holz den Symbionten ähnliche *Hefen* häufig vorkommen, wäre es möglich, daß die ursprüngliche Infektion der *Cerambyciden* vom Larvenstadium ausging, während *Heitz* wegen der Ähnlichkeit der Symbionten mit gewissen *Nektarhefen* vermutet, daß die *Leptura*-Symbiose durch Infektion der blütenbesuchenden Imagines entstanden ist.

Weder in den Mycetocyten noch im Darmlumen fand ich an den Symbionten Erscheinungen, die auf eine Verdauung durch den Wirt hindeuten.

3. *Zusammenfassung.*

Die Pilzvegetation des Darminhaltes und der Fraßgänge von *Anobiiden*- und *Cerambyciden*-Larven besteht im wesentlichen aus *Schimmelpilzen* und *Hefen*. Andere Organismen treten stark zurück. Bei allen in trockenen Substraten lebenden Formen finden sich fast nur *Penicillium*-Arten.

Bei *Ernobius*-, *Rhagium*- und *Leptura*-Arten konnten die Symbionten aus dem Darminhalt und teilweise aus dem Fraßmehl kultiviert werden.

Mikroskopisch ließen sich bei allen Symbiontenträgern symbiontische und meist auch andere *Hefen* im Darmlumen feststellen.

V. Die Fermente des Larvendarmes.

1. *Einleitung.*

Zur Prüfung der Hypothese *Buchners* ist es notwendig, einen Einblick in die Ernährungsphysiologie der Wirtstiere zu bekommen. Nur wenige Holzfresser sind in dieser Richtung untersucht. *Ripper* (1930) fand weder bei den Raupen des Weidenbohrers (*Cossus cossus*), noch bei den Larven der Gärkammerinsekten *Dorcus parallelepipedus* und *Osmoderma eremita* einen Celluloseabbau im Darm. Das letzte Ergebnis ist besonders überraschend, da *Werner* (1926) aus dem Dickdarm von *Potosia cuprea* (Rosenkäfer) regelmäßig ein Cellulose spaltendes Bakterium gezüchtet hat, und *Wiedemann* (1930) bei *Oryctes nasicornis* und *Osmoderma eremita* eine Cellulose abbauende Mikroflora in den Gärkammern feststellte. *Wiedemann* berichtet, daß eine tiereigene Cellulose bei den Gärkammerlarven fehlt und glaubt, daß der Wirt sich auf dem Umweg über das Bakterieneiweiß durch Verdauung der Darmorganismen die Cellulose nutzbar macht. Die zum Teil mit ungenügenden Methoden ausgeführten Versuche sind jedoch nicht sehr beweisend. Die Widersprüche zwischen den Ergebnissen von *Ripper* einerseits und *Werner* und *Wiedemann* andererseits bedürfen dringend der Klärung. Nur bei den *Termiten* sind durch *Cleveland* (1926, 1928) die Verhältnisse eindeutig erforscht; er konnte zeigen, daß nach Beseitigung

gewisser Cellulose fressender Darm*flagellaten* die Tiere ihre gewohnte Nahrung nicht mehr verwerten können.

Ein Weg, die ernährungsphysiologischen Eigenschaften des tierischen Darmes zu untersuchen, besteht in der Prüfung seiner fermentativen Fähigkeiten. Derartige Versuche haben bei *Anobiiden* und *Cerambyciden* besondere Bedeutung, da sich vielleicht eine Beziehung zwischen Fermentproduktion und Symbionten-Wohnstätte finden läßt. Deshalb wurden in den folgenden Untersuchungen die verschiedenen Darmabschnitte getrennt untersucht. Ferner war zu erwarten, daß bei einer direkten Prüfung der symbiontenführenden Blindsäcke auch diejenigen Eigenschaften der Blindsackorganismen zu erkennen sein würden, die etwa in der Reinkultur verlorengegangen sind. Eine besondere Bedeutung hat bei den Holzfressern der Nachweis von Fermenten, welche die Gerüstsubstanzen des Holzes angreifen, nämlich Cellulase, Hemicellulase und Pentosan spaltende Fermente wie Xylanase.

Über das Vorkommen von Cellulase im Insektenreich liegen in der Literatur nur spärliche Angaben vor. *Biedermann* (1919) fand bei den phytophagen *Orthopteren* ein Cellulose spaltendes Ferment, *Belehradek* (1922) wies im Speichel von *Dixippus morosus* (Heuschrecke) und *Hering* (1929) bei der Raupe von *Cemiostoma* Cellulase nach. Bei *Anobiiden* und *Cerambyciden* hat *Ripper* (1930) das Vorhandensein von Cellulase im Darm festgestellt (Larven von *Xestobium rufovillosum*, *Rhagium bifasciatum*, *Leptura spec.* und *Cerambyx cerdo*). Neben Cellulasen scheinen stets auch Hemicellulasen vorzukommen (*Biedermann*, 1919). Es ist zu erwarten, daß diese Fermente auch bei der Holzverdauung eine bedeutsame Rolle spielen, da Hemicellulosen auch im Holz reichlich vertreten sind. *Seillière* (1905) fand bei Larven von *Phymatodes variabilis* (*Cerambycide*) eine Xylanase.

Oppenheimer (1925) bezweifelt das Vorkommen echter Cellulase bei Tieren und hält alle bis jetzt bekannten Cellulose spaltenden Fermente, auch die von *Schnecken* und *Crustaceen* (*Biedermann* und *Moritz*, 1898; *Bierry* und *Giaja*, 1921; *Karrer*, 1924, 1925) nur für Hemicellulasen. Gewisse Befunde sprechen dafür, daß native Cellulose weit schwerer gespalten wird als solche Cellulose, deren Micellarstruktur bereits verändert ist. Nach *Ripper* greift Darmsaft von *Cerambyx cerdo* native Cellulose (Baumwolle) kaum an, während Oxycellulose (Filtrierpapier) kräftig hydrolysiert wird. Ähnliches berichtet *Seillière* (1906, 1907, 1910) über die *Helix*-Cellulase. Mögen auch gewisse Unterschiede in der fermentativen Spaltbarkeit bei den verschiedenen Cellulosesubstraten bestehen, in der Frage der Holzverdauung steht fest, daß, wie im Abschnitt VII gezeigt wird, durch bestimmte holzfressende Insekten die Gerüstsubstanzen des Holzes verdaut werden, und zwar Ortho- und Hemicellulose in gleicher Weise.

Als Objekte für meine Untersuchungen dienten die Larven von *Oxymirus cursor*, da von ihnen das nötige Material leicht beschafft werden konnte, und weil sie wegen ihrer Größe geeigneter sind, als die kleinen *Anobiiden*. In einzelnen Fällen wurden zu Cellulaseversuchen auch Larven von *Rhagium bifasciatum* und *Cerambyx cerdo* verwendet.

2. *Die Wasserstoffionenkonzentration im Larvendarm.*

Die Versuche von *Wigglesworth* (1927a, 1928) haben gezeigt, daß es auch bei der Prüfung von Insektenfermenten sehr wichtig ist, die Wasserstoffionenkonzentration durch Pufferung der Fermentproben möglichst den natürlichen Verhältnissen im Darm anzupassen, da die Wirksamkeit der Fermente stark vom p_H abhängig ist. Die p_H-Messung in Insektendärmen macht wegen der Kleinheit der meisten Objekte erhebliche Schwierigkeiten. *Biedermann* (1898) konnte durch Verfüttern von Mehl, dem Lackmuspulver zugesetzt war, bei *Tenebrio molitor* im Vorderdarm ausgesprochen saure, im Mitteldarm alkalische Reaktion feststellen.

Es wurde versucht, auf kolorimetrischem und auf elektrometrischem Wege die Wasserstoffionenkonzentration in den verschiedenen Darmabschnitten von *Cerambyciden*-Larven zu ermitteln. Meist ist der Darm der Larven prall mit Nahrung gefüllt, so daß keine Möglichkeit besteht, zur p_H-Bestimmung Darmsaft zu entnehmen. Nur im Winter enthalten die Larvendärme gewöhnlich eine farblose bis schwach gelbliche Flussigkeit. Mit *Merck*s Universalindikator wurde in derartigen Därmen bei *Oxymirus* im Magenabschnitt[1] ein p_H von 6,0 bis 6,2 und im Mitteldarm ein solches von 6,3 bis 6,5 gemessen. Eine Spur Indikatorlösung vermischte ich zu diesem Zweck auf einer weißen Porzellanplatte mit einem Tropfen Darmflüssigkeit. Ferner habe ich mehrfach das p_H von Larvendärmen mit der Chinhydronelektrode bestimmt, indem ich den Inhalt der betreffenden Darmteile in Leitfähigkeitswasser aufschwemmte (Tabelle VII).

Tabelle VII.

Elektrometrische p_H-Messung des Darmsaftes von Oxymirus- und Rhagium-Larven.

	Magenabschnitt	Mitteldarm
Oxymirus cursor 1 . . .	p_H 6,14	p_H 6,39
„ „ 2 . .	„ 6,23	„ 6,36
„ „ 3 . .	„ 6,12	„ 6,32
„ „ 4 . .	„ 6,06	„ 6,42
Rhagium bifasciatum . .	„ 6,08	„ 6,32

Nach beiden Methoden ergab sich also eine geringe Zunahme der Alkalität im Mitteldarm. Ganz ähnlich verhält sich *Blatta germanica*, bei der nach *Wigglesworth* (1927) das durchschnittliche p_H im Kaumagen 5,2 und im Mitteldarm 6,2 beträgt.

Bei den folgenden Versuchen wurde, soweit möglich, in den Fermentproben durch Pufferung ein p_H von 6,4 eingestellt, das etwa dem durchschnittlichem p_H-Wert des Mitteldarmes entspricht.

[1] Den vordersten, vor den Blindsäcken liegenden Abschnitt des Mitteldarmes, der bei *Oxymirus*-Larven oft blasig aufgetrieben ist, bezeichne ich in den folgenden Ausführungen der Kürze halber als „Magen".

3. *Methodik der Fermentprüfung.*

a) Herstellung der Fermentlösungen.

Eine Anzahl herauspräparierter Larvendärme wurden in Mitteldärme, Magenabschnitte und Blindsäcke getrennt. Jede Portion für sich verrieb ich in einem Uhrglas mit einem rundgeschmolzenen Glasstab unter Zusatz von etwas Quarzsand und einigen Tropfen Glycerin, bis eine feine Emulsion entstanden war; dann setzte ich 50%iges Glycerin zu, das einige Tropfen 5%ige alkoholische Thymollösung enthielt. Diese Glycerinextrakte sind, bei etwa 12° C aufbewahrt, wochenlang haltbar, zeigen allerdings eine Abnahme ihrer Wirksamkeit. Neben Glycerinextrakten verwendete ich bei meinen Versuchen auch Wasserextrakte, die sich in mancher Beziehung günstiger erwiesen, da gewisse Fermente durch Glycerin geschädigt werden. Ihre Herstellung war die gleiche, nur trat an Stelle des 50%igen Glycerins destilliertes Wasser mit Thymolzusatz. Vor Gebrauch wurden die Fermentlösungen zentrifugiert.

Es ist schwierig, in den verschiedenen Fermentextrakten die gleichen Fermentkonzentrationen einzustellen. Man müßte etwa so verfahren, daß ein stark wirksames Ferment (Amylase) als Grundlage für die Normung dient, und die verschiedenen Extrakte so lange verdünnt werden, bis eine bestimmte relative Aktivität dieses Standardferments erzielt ist. Da mir für eine derartige Versuchsanordnung zu wenig Material zur Verfügung stand, mußte ich davon absehen. Ich verfuhr deshalb in der Weise, daß ich für eine bestimmte Menge Extraktionsflüssigkeit stets die gleiche Anzahl Darmteile von großen bis mittelgroßen Larven verwendete, und zwar kamen die Darmteile (Magenabschnitte, Blindsäcke und Mitteldärme) von sechs Tieren auf je 1 ccm Flüssigkeit. Quantitative Feststellungen über die Fermente der Larvendärme liegen außerhalb des Rahmens dieser Arbeit. Es sollte nur qualitativ auf die verschiedenen Fermente geprüft werden, wobei die Versuchsanordnung es erlaubte, jeweils ungefähr auf den Grad der Wirksamkeit zu schließen.

Man könnte einwenden, daß die an Volumen hinter den Mitteldärmen wesentlich zurücktretenden Anhänge durch die gleichmäßige Dosierung der Flüssigkeit bei der Herstellung der Fermentextrakte eine zu schwache Fermententwicklung vortäuschen. Es ist jedoch klar, daß, wenn die Blindsäcke als Fermentproduzenten für die Verdauung irgendwie wesentlich in Frage kommen, dies bei der angewandten Versuchsanordnung zweifellos zum Ausdruck kommen müßte. Um ganz sicher zu gehen, wurden bei den sehr wichtigen Celluloseversuchen in mehreren Fällen unverdünnte Darmsäfte verwendet oder die Extrakte mit möglichst wenig Wasser hergestellt.

Die Fermentversuche führte ich in der Regel in der Weise durch, daß in kleinen Reagensröhrchen (8 cm lang, 1 cm weit) 0,5 ccm Substratlösung, 0,2 ccm Fermentextrakt und 0,3 ccm Phosphatpuffer nach *Sörensen* ($p_H = 6{,}4$) gemischt wurden. Die Röhrchen stellte ich gut verkorkt im Thermostaten bei 38° C auf. Sehr wichtig ist die unbedingte Ausschaltung von Mikroorganismen in den Fermentproben. Durch den Thymolzusatz ist ja schon weitgehend für Keimfreiheit gesorgt; stets wurde aber auch mikroskopisch auf Bakterienfreiheit kontrolliert.

b) Carbohydrasen.

Es wurde auf folgende Fermente geprüft: Amylase (Diastase), Inulase, Invertase (Saccharase), Maltase, Lactase, Emulsin, Cellulase (Cytase), Hemicellulase (Cytase) und Xylanase.

Als Substrate (Präparate von *Merck*) dienten folgende Lösungen: 2% lösliche Stärke, 2% Inulin, 2% Dextrin, 2% Saccharose, 0,25% Maltose, 0,25% Lactose, 1% Amygdalin. Ferner wurden verwendet: Filtrierpapier und Schnitte durch Pflanzenteile als Cellulose- oder Hemicellulosesubstrat, Xylan aus Weizenstroh[1] als Pentosansubstrat.

Zum Nachweis der aus diesen Substanzen durch Carbohydrasen abgespaltenen reduzierenden Stoffe waren die gewöhnlichen qualitativen Methoden, z. B. die *Fehling*sche Reaktion, meist ungeeignet, da ich mit sehr kleinen Flüssigkeitsmengen arbeiten mußte, und es bei Maltose und Lactose, die an sich schon reduzierend wirken, auf die Feststellung der Erhöhung des Reduktionsvermögens ankam. Ich verwendete deshalb eine quantitative Methode, die Mikroblutzuckerbestimmung nach *Hagedorn* und *Jensen* (bei *Rona*, 1928 und *Klein*, 1932). Es erübrigt sich, auf diese Methode hier näher einzugehen, zumal sie von *Lehmann* (1931) auch für pflanzliche Objekte eingehend geprüft wurde.

Zu jedem Versuch setzte ich einen Blindversuch an, bei dem das Ferment durch einstündiges Erhitzen im Wasserbad inaktiviert worden war. Da hierbei die Gefahr bestand, daß die Flüssigkeit zum Teil eindunstet, inaktivierte ich die betreffende Fermentlösung vor der Zugabe zu den Substratflüssigkeiten und ersetzte dann das verdunstete Wasser wieder. Der Wert des Blindversuchs kam nach der Vorschrift von *Hagedorn* und *Jensen* erst nach Umrechnung in Glucose vom Glucosewert des eigentlichen Versuchs in Abzug. Manchmal stand mir nicht genügend Darmextrakt zur Verfügung, um stets einen Blindversuch mit inaktivierter Fermentlösung anzusetzen; in diesem Falle nahm ich zu den Kontrollversuchen statt Fermentlösung destilliertes Wasser. Da die Darmextrakte selbst reduzierende Stoffe enthielten, mußte der dadurch entstandene Fehler durch entsprechende Korrekturwerte ausgeglichen werden, die ich dadurch erhielt, daß in einer kleinen Menge Fermentlösung die Eigenreduktion bestimmt wurde. Die Berechnung der Maltose- und Lactosewerte erfolgte im Anschluß an die Tabelle von *Pucher* und *Finch* (bei *Klein*, II, 1, S. 792, 1932).

Zum Nachweis der fermentativen Spaltung von Stärke, Dextrin und Amygdalin konnten, da die dabei in Frage kommenden Fermente stark wirksam sind, auch gröbere qualitative Methoden verwendet werden wie die Jod-Stärke-Reaktion und die *Fehling*sche Reaktion.

Zum Cellulase- und Hemicellulase-Nachweis benutzte ich meist die einfache und bequeme qualitative Mikromethode von *Ripper* (1930). *Ripper* dienten als Substrat Gefrierschnitte durch Salatstengel. Ich verwendete Rasiermesserschnitte durch verschiedene Pflanzenteile, insbesondere durch dünne Wurzeln von *Iris* und durch das Endosperm von *Tropaeolum*-Samen, das reich an Hemicellulose ist. Da an reinen Zellwandpräparaten die Vorgänge der fermentativen Auflösung besser zu beobachten sind, wurde aus den Schnitten bei einem Teil der Versuche der Zellinhalt mit Chloralhydrat herausgelöst und danach das Chloralhydrat gründlich mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Die Schnitte lagen auf einem hohlgeschliffenen Objektträger in einem Tropfen Darmsaft oder Fermentlösung. Bei diesen Cellulaseversuchen setzte ich den Fermentlösungen als Desinfiziens statt Thymol in der Regel Toluol zu. Die Objektträger wurden in einem ver-

[1] Für die Überlassung eines Xylanpräparates bin ich Herrn Dr. *M. Lüdtke*-Bonn zu Dank verpflichtet.

schlossenen Glasgefäß, dessen Boden mit toluolhaltigem Wasser bedeckt war, im Thermostaten bei 38° C aufbewahrt. Bei der täglichen Durchsicht fügte ich stets neues Toluol zu. Die Veränderungen an den Zellwänden sind in ungefärbtem Präparat schon deutlich; zur Kontrolle prüfte ich bei Abschluß der Versuche stets mit Chlorzinkjod (*Hertzberg*, 1923) auf Cellulose und mit Jodjodkali auf Hemicellulose.

Auch quantitativ wurde auf Cellulase geprüft durch Bestimmung der fermentativ abgespaltenen reduzierenden Stoffe mit der *Hagedorn-Jensen*schen Methode. Als Substrate dienten 0,02 g Filtrierpapierschnitzel in 0,5 ccm destillierten Wassers, dem die üblichen Mengen Fermentextrakt und Pufferlösung zugefügt wurden. In gleicher Weise untersuchte ich das Xylanspaltungsvermögen der Larvendärme. Ich benutzte eine Aufschwemmung von 0,01 g Xylan in 0,5 ccm Wasser als Substrat. Die ermittelten Glucosowerte wurden bei Xylan auf Xylose umgerechnet nach der Tabelle von *Schoorl* (bei *Klein*, l. c. S. 787.)

c) Lipasen.

Die Prüfung erfolgte nach den Angaben von *Wigglesworth* (1928). Als Substrat verwendete ich folgende vor Gebrauch genau neutralisierte Lösungen und Emulsionen: 25% Olivenöl (wässerige Emulsion), 1% Monobutyrin, 5% Äthylbutyrat (Äther butyricus), 2% Lecithin aus Eiern (wässerige Emulsion). Die abgespaltenen Säuren wurden mit n/100 NaOH gegen Brom-Thymolblau titriert. Bei den Lipaseversuchen mußte der Puffer wegbleiben, dafür wurde 0,8 ccm Substrat und 0,2 ccm Fermentlösung genommen. Die Versuche standen im Thermostaten bei 38° C; jeweils lief ein Kontrollversuch mit inaktivierter Fermentlösung mit.

d) Proteasen.

Es wurde bei Zimmertemperatur auf folgende Fermente geprüft: Pepsin, das bei stark saurer Reaktion wirksam ist, Trypsin, das nur in neutraler bis schwach alkalischer Lösung Eiweißkörper angreift, und Erepsin, das Pepton abbaut. Zum Nachweis verwendete ich eine relativ grobe, aber sehr einfache Methode, da es sich hier ja nur um eine orientierende Feststellung handeln sollte. *Wigglesworth* benutzte die etwas umständliche Formoltitration nach *Sörensen* zum Nachweis der gebildeten Aminosäuren. Ich wählte die bei *Wohlgemut* (1913) beschriebenen Versuchsanordnungen in etwas veränderter Form.

Für den Pepsinnachweis wurde zu einer Mischung von 0,8 ccm 0,1 %iger Salzsäure und 0,2 ccm Fermentlösung eine mit Karmin gefärbte Fibrinflocke zugegeben. Tritt eine Eiweißverdauung ein, so färbt das frei werdende Karmin die Lösung rot. Stets muß ein Kontrollversuch mit inaktivierter Fermentlösung angesetzt werden, um Täuschungen durch selbsttätig austretenden Farbstoff zu vermeiden.

Zum Trypsinnachweis diente als Substrat eine mit Kongorot gefärbte Fibrinflocke, die ich zu einer Mischung von 0,5 ccm destilliertem Wasser, 0,3 ccm Phosphatpuffer und 0,2 ccm Fermentextrakt zugab. Das p_H stellte ich auf 6,4 und 8,0 ein, um auch den alkalischen Bereich zu prüfen.

Die Wirkung von Erepsin untersuchte ich ebenfalls bei $p_H = 6{,}4$ und 8,0. Als Substrat verwendete ich 0,5 ccm 0,5%ige Peptonlösung (*Witte*-Pepton), dem 0,3 ccm Puffer und 0,2 ccm Fermentextrakt zugesetzt wurden. Zum Nachweis diente die Biuretreaktion, die um so schwächer war, je stärker Pepton gespalten wurde.

e) Andere Fermente.

Von den übrigen Fermenten wurden noch Nuclease, Urease, Histocym und Tyrosinase in den Kreis der Untersuchung gezogen. Ich verfuhr ebenfalls nach den Angaben von *Wohlgemut* und nahm als Substrat (Präparate von *Merck*) 0,7 ccm folgender Lösungen: 1,0 % Natrium nucleinicum aus Hefe, 1,0 % Harnstoff, 0,5 % Hippursäure, 1,0 % Tyrosin. Zum Nachweis der Nuclease diente das Auftreten der Phosphatreaktion (Mg-Mischung). Zum Nachweis von Harnstoffspaltung wurde mit *Nesslers* Reagens auf Ammoniak geprüft. Die Prüfung auf Histocym erfolgte durch Identifizierung der mit Ligroin ausgeschüttelten Benzoesäure mit $FeCl_3$. Bei der Oxydation von Tyrosin durch Tyrosinase färbte sich die Lösung mehr oder weniger dunkel.

Natürlich mußte stets auch ein Kontrollversuch angesetzt werden.

4. Ergebnis der Fermentversuche.

a) Carbohydrasen.

An Carbohydrasen ließ sich vor allem ein kräftiges, Stärke und Dextrin abbauendes Ferment nachweisen (Tabelle VIII und IX). Die Amylase war sowohl im Magenabschnitt, wie im Mitteldarm sehr stark wirksam, schien aber in den Blindsäcken nur in Spuren vorhanden zu sein. Das Polysaccharid Inulin wurde nicht abgebaut. Von den disaccharidspaltenden Fermenten Invertase, Maltase und Lactase waren in den Glycerinextrakten Invertase kaum, die beiden anderen Fermente gar

Tabelle VIII.

Fermentative Spaltung von Stärke, Dextrin und Amygdalin durch Glycerinextrakte von *Oxymirus*-Därmen.

	Jodreaktion nach 12 Std.	Stärke der *Fehling*schen Reaktion nach 12 Std. (in Klammer nach 8 Tagen)
Stärke:		
Magen	hellviolettrot	+
Blindsäcke	dunkelblau	0
Mitteldarm	farblos	++
Kontrolle	dunkelblau	0
Dextrin:		
Magen	farblos	—
Blindsäcke	dunkelviolett	—
Mitteldarm	farblos	—
Kontrolle	violett	—
	Blausäuregeruch nach 12 Std. (in Klammer nach 8 Tagen)	
Amygdalin:		
Magen	+ (++)	+ (++)
Blindsäcke	0 (+)	0 (+)
Mitteldarm	+ (+++)	+ (+++)
Kontrolle	0 (0)	0 (0)

Tabelle IX.

Fermentative Spaltung von Poly- und Disacchariden durch Wasserextrakte von *Oxymirus*-Därmen.

Die Zahlen bedeuten Milligramm gebildete reduzierende Stoffe, berechnet als Glucose.

	Nach 2 Std.	Nach 24 Std.	Nach 3 Tagen
Stärke:			
Magen	0,018	0,342	0,413
Blindsäcke	0,000	0,046	0,076
Mitteldarm	0,030	0,416	0,497
Inulin:			
Magen	0,007	0,000	0,003
Blindsäcke	0,000	0,002	0,005
Mitteldarm	0,005	0,004	0,010
Saccharose:			
Magen	0,014	0,046	0,830
Blindsacke	0,002	0,018	0,200
Mitteldarm	0,019	0,092	0,253
Maltose:			
Magen	0,000	0,024	0,052
Blindsacke	0,002	0,000	0,003
Mitteldarm	0,015	0,072	0,138
Lactose:			
Magen	0,000	0,001	0,024
Blindsacke	0,000	0,000	0,005
Mitteldarm	0,003	0,024	0,032

nicht nachweisbar. *Wigglesworth* fand bei *Blatta*-Invertase eine teilweise Hemmung durch 20 % Glycerin, während *Blatta*-Maltase und *Blatta*-Lactase durch 10 % Glycerin vollkommen gehemmt wurden. In Wasserextrakten von Mitteldarm- und Magenabschnitten waren eine kräftige Invertase und eine Maltase vorhanden, dagegen Lactase nur in Spuren (Tabelle IX). In den Blindsäcken ließen sich nur Spuren von Invertase feststellen. Ein weiteres Ferment, das hierher gehört und in seiner Wirkungsintensität im Darmrohr der Larven etwa der Amylase gleichkam, das Glucosid spaltende Ferment Emulsin, war stets nachweisbar (Tabelle VIII). Auch dieses Ferment war in den Blindsäcken nur schwach wirksam.

Durch qualitative Mikroversuche nach *Ripper* wurden Darmsäfte verschiedener *Cerambyciden*-Larven auf Cellulase geprüft (Tabelle X). Es zeigte sich, daß die Bockkäferlarven eine Cellulase besitzen, die allerdings, verglichen mit der *Helix*-Cellulase, relativ schwach ist. *Ripper* hat schon darauf hingewiesen, daß das Vorkommen von Cellulase bei Bockkäfern keineswegs an die Symbiose gebunden ist: *Cerambyx cerdo* ist symbiontenfrei und besitzt trotzdem im larvalen Darm eine Cellulase; dieses Ergebnis konnte ich bestätigen.

Tabelle X.

Einwirkung von verdünnten Darmsäften auf Querschnitte durch die Mittelrippe der Blätter von *Leontodon taraxacum*. Ergebnis nach 36 Stunden bei 30° C.

Darmsaft von	
Oxymirus cursor	Zellwände stark korrodiert, nur undeutlich sichtbar
Rhagium bifasciatum	„ „ „ „ „ „
Cerambyx cerdo	„ „ „ „ „ „
Helix-Darmsaft .	„ vollständig gelöst
Kontrolle (Wasser) .	„ unverändert

Tabelle XI.

Einwirkung von Glycerinextrakten von *Oxymirus*-Därmen auf Cellulose und Hemicellulose.

Substrate Schnitte durch *Iris*-Wurzeln und durch *Tropaeolum*-Endosperm. Die Zeichen geben die Stärke der Fermentwirkung nach 3 Tagen bei 38° C an.

	Cellulose (*Iris* Wurzel)	Hemicellulose (*Tropaeolum* Endosperm)
Magen .	+	+
Blindsäcke . .	0	(+)
Mitteldarm .	++	+++
Kontrolle (50 %iges Glycerin)	0	0

Ferner prüfte ich Glycerin- und Wasserextrakte der verschiedenen Darmabschnitte von *Oxymirus*-Larven (Tabelle XI). Hemicellulose von *Tropaeolum*-Samen wurde stärker gespalten als Cellulose. In den *Tropaeolum*-Schnitten lösten sich zuerst die Wandverdickungen aus Hemicellulose auf, die innerste Wandschicht aus Cellulose blieb übrig und wurde schließlich auch angegriffen In den Wurzelquerschnitten bekam besonders das Gewebe der Wurzelrinde ein zerfasertes Aussehen und löste sich vielfach ganz auf. Auf diese Weise ließen sich Cellulase und Hemicellulase im Magen und Mitteldarm gut nachweisen, während durch die Extrakte der Blindsackabschnitte nur eine kaum wahrnehmbare Hemicellulasewirkung erzielt werden konnte. Aus Tabelle XII geht hervor, daß auch leere gewaschene Mitteldarmschläuche, nachdem sie in geeigneter Weise zerrieben wurden, eine, wenn auch nur schwache, Cellulase- und Hemicellulase-Reaktion geben. Diese Fermente wurden also wahrscheinlich im Mitteldarmepithel produziert. In hyalinen, mit wenig Flüssigkeit gefüllten, kollabierten Därmen von Hungertieren sind die beiden Fermente ebenfalls, doch schwächer als in normalen Därmen nachweisbar Teile des Mitteldarms einer *Oxymirus*-Larve, der die Blindsäcke mit Symbionten vollkommen fehlten (vgl. Abschnitt VII), erwiesen sich bei der Prüfung auf Cellulase ebenfalls als eindeutig positiv.

Tabelle XII.

Einwirkung von Wasserextrakten verschiedener Darmteile von *Oxymirus*-Larven auf Cellulose und Hemicellulose.

Die Darmteile wurden in möglichst wenig Wasser verrieben. Im übrigen siehe Tabelle XI.

	Cellulose (*Iris*-Wurzel)	Hemicellulose (*Tropaeolum*-Endosperm)
Normal gefüllte Mitteldärme von zwei Larven .	++	+++
Magenabschnitte dazu	+	++
Blindsäcke dazu	0	(+)
Leere Mitteldärme von vier Larven, Inhalt herausgespült	(+)	+
Hyaline mit wenig Flüssigkeit gefüllte Mitteldärme von vier Larven .		+
Mitteldarmabschnitte einer Larve ohne Blindsäcke, sonst normal und mit Nahrung gefüllt	++	+++
Kontrolle (Wasser) .	0	0

Neben diesen qualitativen Feststellungen wurde der Nachweis der Cellulosespaltung auch auf quantitativem Wege durch Bestimmung der abgespaltenen, reduzierenden Stoffe versucht *Ripper* hat als Substrat Filtrierpapier und Baumwolle benutzt und durch Zurückwägen den nicht verdauten Anteil bestimmt Ich prüfte neben Filtrierpapier auch ein Pentosan, nämlich Xylan aus Weizenstroh Pentosane sind ja besonders in Laubholz reichlich vorhanden und spielen mög-

Tabelle XIII

Fermentativer Abbau von Polysacchariden durch Wasserextrakte von *Oxymirus*-Därmen

Die Zahlen bedeuten Milligramm gebildeten reduzierenden Zuckers, bei Cellulose und Stärke als Glucose, bei Xylan als Xylose berechnet

Substrat	Nach 6 Std	Nach 24 Std	Nach 3 Tagen
Cellulose			
Magen .	0,005	0,057	0,078
Blindsäcke	0,000	0,007	0,012
Mitteldarm	0,038	0,066	0,093
Xylan			
Magen .	0,040	0,102	0,105
Blindsäcke	0,016	0,022	0,034
Mitteldarm	0,078	0,160	0,163
Stärke			
Magen .	0,132	0,356	0,403
Blindsäcke	0,028	0,053	0,068
Mitteldarm	0,206	0,421	0,485

licherweise für die Ernährung holzfressender Insekten eine nicht unbedeutende Rolle. Aus Tabelle XIII ist die kräftige Xylanspaltung durch die Fermente des Extraktes ersichtlich, während Cellulase weniger stark wirksam war. Zum Vergleich sind mit denselben Fermentlösungen erhaltene Werte für die viel stärker wirkende Amylase beigefügt. Im Mitteldarm und Magen waren die Fermente deutlich nachzuweisen. Die Blindsäcke zeigten praktisch keine Cellulasewirkung; auch ihr Xylanspaltungsvermögen war sehr gering.

Tabelle XIV.

Spaltung von Estern und Fetten durch Extrakte von *Oxymirus*-Darmen. (* = Wasserextrakt, alles übrige Glycerinextrakt.) Die Zahlen bedeuten Kubikzentimeter n/100 NaOH, die zur Neutralisation der gebildeten Säure in 1 ccm Lösung verbraucht wurden.

	Nach 24 Std.	Nach 3 Tagen	Nach 4 Tagen
Monobutyrin:			
Magen	0,05	0,40 *	1,00
Blindsäcke	0,00	0,25 *	0,60
Mitteldarm	0,15	0,70 *	1,10
Äthylbutyrat:			
Magen	0,05	—	0,15
Blindsäcke	0,00	—	0,10
Mitteldarm	0,14	—	0,40
Olivenöl:			
Magen	0,00	0,10	—
Blindsäcke	0,00	0,00	—
Mitteldarm	0,05	0,30	—
Lecithin:			
Magen	0,00	—	0,10
Blindsäcke	0,00	—	0,10
Mitteldarm	0,10	—	0,60

b) Lipasen.

Fett und Ester spaltende Fermente waren in allen Darmabschnitten wirksam, besonders stark im Mitteldarm, weniger stark im Magen und wieder nur schwach in den Blindsäcken (Tabelle XIV). Von den geprüften Stoffen wurde Monobutyrin am stärksten und Olivenöl am schwächsten gespalten.

c) Proteasen.

Wigglesworth konnte bei *Blatta* kein Pepsin feststellen. Auch bei *Oxymirus* fehlte dieses Ferment, was durchaus verständlich ist, da im Darmtraktus der Larven die Wasserstoffionenkonzentration nie so steigt, daß Pepsin wirksam werden kann.

Trypsin war nachweisbar (Tabelle XV) und wirkte im alkalischen Gebiet ($p_H = 8{,}0$) stärker als bei $p_H = 6{,}4$, das etwa den normalen

Tabelle XV.

Wirksamkeit von Trypsin und Erepsin in Glycerinextrakten von *Oxymirus*-Därmen.

Versuchsdauer 2 Tage. Die Zeichen geben bei Trypsin die Stärke der Fibrinverdauung, bei Erepsin die Stärke der Biuretreaktion an.

	Fermentwirkung bei	
	$p_H = 6,4$	$p_H = 8,0$
Trypsin:		
Magen	(+)	+
Blindsäcke	0	+
Mitteldarm	+	+++
Kontrolle	0	0
Erepsin:		
Magen	+++	++
Blindsäcke	+++	++
Mitteldarm	+	(+)
Kontrolle	+++	+++

Verhältnissen in Larvendarmen entspricht. Die gleiche Beobachtung konnte beim Erepsin (Tabelle XV) gemacht werden. Dieser Befund steht gut im Einklang mit den Ergebnissen von *Wigglesworth* (1928), der fur *Blatta*-Trypsin als Optimum p_H = 7 bis 8 und fur *Blatta*-Erepsin p_H = 8,5 angibt, also Wasserstoffionenkonzentrationen, die auch im

Tabelle XVI.

Zusammenstellung der bei *Cerambyciden*-Larven (*Oxymirus cursor*) nachgewiesenen Darmfermente.

Die Zeichen geben ungefahr den Grad ihrer Wirksamkeit an.

Ferment	Substrat	Magen	Blindsäcke	Mitteldarm
Cellulase	Cellulose	+	0	+
Hemicellulase	Hemicellulose	+	(+)	++
Xylanase	Xylan	+	(+)	++
Amylase	Starke	++++	+	++++
Inulinase	Inulin	0	0	0
Invertase	Saccharose	+	0	+++
Maltase	Maltose	(+)	0	++
Lactase	Lactose	0	0	(+)
Emulsin	Amygdalin	++++	+	++++
Lipase	Ester und Fette	+	(+)	++
Pepsin	Fibrin	0	0	0
Trypsin	Fibrin	0	0	+
Erepsin	Pepton	0	0	++
Nuclease	Natrium nucleinicum	0	0	0
Urease	Harnstoff	(+)	(+)	+
Histocym	Hippursäure	0	0	0
Tyrosinase	Tyrosin	+	0	(+)

Blatta-Darm nicht auftreten. Doch fand *Wigglesworth*, daß zum Unterschied von Pankreastrypsin die Aktivität des *Blatta*-Trypsins weiter in das saure Gebiet hineinreicht.

d) Andere Fermente.

Von den übrigen noch geprüften Fermenten waren eine schwache Urease und Tyrosinase vorhanden. Histocym und Nuclease scheinen zu fehlen (Tabelle XVI).

5. Zusammenfassung.

Die im Darm der *Cerambyciden*-Larven aufgefundenen Fermente sind in Tabelle XVI zusammengestellt. Besonders bemerkenswert ist das Vorkommen von Cellulase, mit deren Nachweis das Ergebnis *Ripper*s bestätigt werden konnte. Auch Hemicellulase und Xylanase sind vorhanden. Die symbiontengefüllten Blindsäcke zeichnen sich aber in keiner Weise gegenüber den übrigen Darmabschnitten aus. Sie sind fast durchweg fermentfrei oder doch sehr fermentarm. Den Symbionten scheint also keine Bedeutung als Fermentproduzenten zuzukommen.

VI. Vergleichende Substrat- und Kotanalysen.

1. Einleitung.

Wieweit überhaupt eine Celluloseverdauung im Darm der Holzfresser stattfindet, läßt sich mit Hilfe von vergleichenden Futterholz- und Kotanalysen entscheiden. Diese Methode bietet gegenüber reinen Fermentversuchen den Vorteil, daß die Holzverdauung unter natürlichen Verhältnissen und mit natürlichen Substraten vor sich geht, und daß sie ein genaues Bild der mengenmäßigen Veränderungen der einzelnen Komponenten der Holzsubstanz gibt. Die Analysenergebnisse sagen aber nichts darüber aus, ob die beteiligten Fermente vom Tier, von den intracellulären Symbionten oder von der Darmflora stammen.

In der Literatur liegen nur wenige vergleichende Futterholz- und Kotanalysen von holzfressenden Insekten vor. *Ripper* (1930) hat auf diesem Wege den Nachweis erbracht, daß weder die Raupen von *Cossus*, noch die Larven von *Dorcus parallelepipodus* (*Lamellicornier*) Cellulose verdauen. *Campbell* (1929) untersuchte Futterholz und Kot einer *Lyctus*-Art ohne Erfolg; dagegen fand er im Kot von *Xestobium rufovillosum* eine starke Celluloseabnahme, ein Ergebnis, das *Ripper* bestätigt hat. *Falk* (1930) hat mit derselben Methode *Anobium striatum* und *Hylotrupes bajulus* (Hausbock) mit Erfolg untersucht.

2. Methode.

Das Material zur Kotanalyse wurde in der Weise gewonnen, daß ich die in den Larvengängen festgestopften Exkremente sammelte und in lufttrockenem Zustande durch feine Siebe von gröberen Holzteilchen befreite. Ganz feiner Staub wurde ebenfalls durch Aussieben entfernt.

so daß nur Kotballen übrigblieben. Zur Analyse des Futterholzes stellte ich mit Hilfe einer Feile aus dem den Gängen benachbarten Holz feines Holzmehl her. Die Analyse erstreckte sich auf folgende Holzbestandteile:

Alkohol-Benzolextrakt: Bestimmung durch Extraktion des lufttrockenen Materials mit Alkohol-Benzol-Gemisch 1 : 1 während 8 Stunden im *Soxhlet*-Apparat (*Schwalbe-Sieber*, 1928). Der Extrakt enthält im wesentlichen Harz. Das extrahierte Material wurde ausgewaschen und bei 105° C getrocknet, um für die weiteren Analysen verwendet zu werden.

Protein[1]: Bestimmung des Gesamtstickstoffs durch *Kjeldahl*-Aufschluß und Umrechnung auf Rohprotein durch Multiplikation des N-Wertes mit der 6,25.

Lignin: Bestimmung nach *König* und *Becker* mit 72%iger Schwefelsäure (*Schwalbe-Sieber*, 1928).

Gesamtpentosan: Bestimmung durch Furfuroldestillation nach *Tollens* und Fällung des gebildeten Furfurols als Furfurolphloroglucid (*Klein*, 1932).

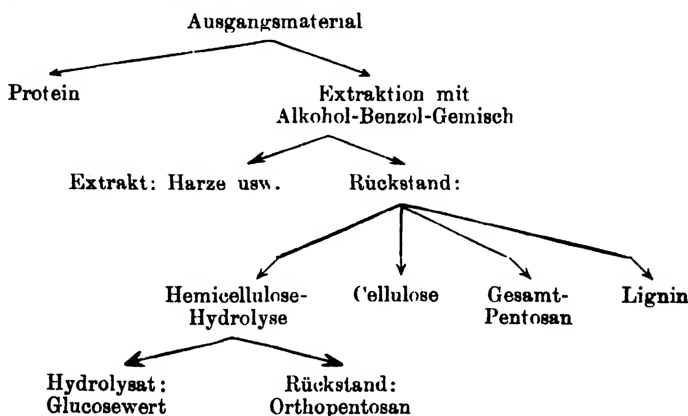
Orthopentosan: Bestimmung im Rückstand des Hemicelluloseaufschlusses nach *König* und *Becker* (1929) durch Furfuroldestillation.

Hemipentosan: Wird errechnet aus der Differenz von Gesamtpentosan und Orthopentosan.

Glucosewert: Im Hydrolysat des Hemicelluloseaufschlusses nach *König* und *Becker* (1919) wurde das Reduktionsvermögen nach *Meissl-Allihn* bestimmt. Das erhaltene CuO wurde als Glucose in Prozent der Ausgangsmenge berechnet. Dieser Glucosewert umfaßt die Gesamtheit leicht hydrolysierbarer Stoffe, die Körper mit reduzierenden Gruppen abspalten (Hexosen, Pentosen, Cellulosedextrine usw.). Obwohl dieser Wert kein exakter Ausdruck des Hemicellulosegehaltes ist, ist er doch gut brauchbar zur Feststellung des leichter spaltbaren Anteils im Holz.

Cellulose: Bestimmung mit der Chlordioxyd-Natriumsulfit-Methode nach *Schmitt*, *Gessler*, *Arndt* und *Ihlow*; Nachbehandlung mit 5%iger Natronlauge (*Klein*, 1932).

Schema des Analysenganges:



---

[1] Die Proteinbestimmungen hat Herr Dr. *E. Falk* in freundlicher Weise übernommen, wofür ich auch an dieser Stelle Dank sage.

Da für die Analysen harzfreies Material verwendet wurde, mußte zu den Einwagen der jeweilige Wert des Alkohol-Benzolextraktes prozentual hinzugerechnet werden.

Bei der Berechnung der Ergebnisse diente Lignin als Bezugsgröße, da Lignin bei der Verdauung nicht angegriffen zu werden scheint. *Falk* (1930) zeigte, daß man ebensogut den Aschengehalt als Bezugsgröße nehmen kann, und daß beide Wege zum gleichen Ergebnis führen. Die Werte der Kotanalyse werden berechnet, indem man den Ligninwert der Kotanalyse dem Futterholz-Ligninwert gleichsetzt und sodann alle Werte entsprechend umrechnet (vgl. *Ripper* 1930). Diese reduzierten Werte geben ein sehr anschauliches Bild von den Veranderungen in der Zusammensetzung des Holzes.

Die prozentuale Abnahme der einzelnen Komponenten habe ich berechnet, indem ich die Differenz zwischen den Futterholz- und den reduzierten Kotwerten in Prozenten der Futterholzwerte ausdrückte.

3. *Versuchsergebnisse.*

a) Anobiiden.

Die Analyse eines von *Anobium striatum* befallenen Erlenholzes ergab eine starke Celluloseabnahme im Kot. Auch die Werte für Glucose, Gesamt-, Hemi- und Orthopentosan sind deutlich erniedrigt, ferner

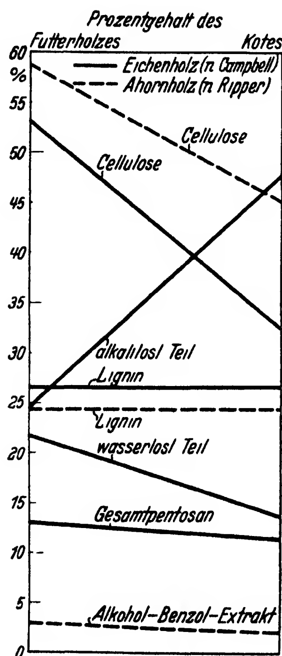


Abb. 29.
Xestobium rufovillosum aus Eichenholz und Ahornholz. Futterholz- und Kotanalysen nach *Campbell* und *Ripper*.

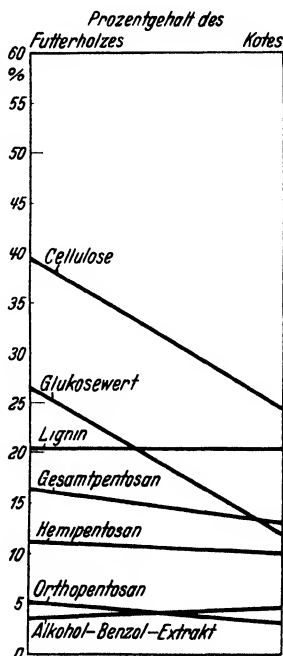


Abb 30.
Gracilia minuta aus Weidenholz. Futterholz- und Kotanalyse.

auch der Proteingehalt (vgl. Tabelle XVII). *Falk* kam zu ähnlichen Ergebnissen im Verhalten der Cellulose, während eine Abnahme des Gesamtpentosans bei ihm nicht ersichtlich ist. Die Werte von *Campbell* und *Ripper* für *Xestobium rufovillosum* sind in Abb. 29 dargestellt. Sie bieten im wesentlichen dasselbe Bild. Auffällig ist bei den Ergebnissen *Campbells* die starke Zunahme des alkalilöslichen Anteils im Holz.

b) Cerambyciden.

Von den *Cerambyciden* untersuchte ich *Oxymirus cursor*, *Leptura rubra* und die symbiontenfreie *Gracilia minuta* (Abb. 30). Die Ergebnisse waren ähnlich wie bei *Anobium striatum*. Bei *Oxymirus* war die prozentuale Abnahme der Cellulose und des Glucosewertes besonders groß (49,2 und 49,1 %), vgl. Tabelle XVIII. Bei *Leptura rubra* sind die entsprechenden Werte erheblich niedriger (Tabelle XIX). *Falks* Analysenwerte bei *Hylotrupes bajulus* sind ganz ähnlich, unterscheiden sich aber auch hier wieder im Verhalten der Pentosane. Bei *Oxymirus* war im Kot auch der Proteingehalt deutlich herabgesetzt

Bemerkenswert ist, daß *Gracilia minuta* (Tabelle XX, Abb. 30) und *Hylotrupes bajulus* sich in der Holzverdauung in keiner Weise von den übrigen Formen unterscheiden, obgleich sie keine intracelluläre Symbiose besitzen.

c) Siriciden.

Die Analysen zeigten, daß auch *Sirex gigas* und *S. phantoma* die Fähigkeit haben, Cellulose zu verdauen (Tabellen XXI und XXII). Auch die ubrigen Bestandteile des Holzes verhielten sich ähnlich wie bei den *Anobiiden* und *Cerambyciden*. Der Harzgehalt zeigte bei *Sirex*

Tabelle XVII.

Futterholz- und Kotanalyse von Anobium striatum, Erlenholz.

	Futterholz %	Exkremente %	Exkremente reduzierter Wert	Exkremente Abnahme %
Alkohol-Benzol-Extrakt	3,4	4,7	3,7	—
Protein	1,62	1,62	1,27	21,6
Lignin	26,0	33,3	26,0	—
Gesamtpentosan	23,4	20,9	16,3	30,3
Orthopentosan	4,5	5,1	4,0	11,1
Hemipentosan	18,9	15,8	12,3	34,9
Glucosewert	24,2	22,0	17,2	28,9
Cellulose	44.5	42.4	33.0	30.9

Tabelle XVIII.

Futterholz- und Kotanalyse von Oxymirus cursor, Fichtenholz.

	Futterholz %	Exkremente %	Exkremente reduzierter Wert	Exkremente Abnahme %
Alkohol-Benzol-Extrakt	2,3	2,7	1,8	21,7
Protein	1,0	1,31	0,88	12,0
Lignin	32,4	48,1	32,4	—
Gesamtpentosan	10,6	11,5	7,8	26,4
Orthopentosan	3,2	3,7	2,5	21,8
Hemipentosan	7,4	7,8	5,3	28,4
Glucosewert	23,3	18,3	12,3	47,2
Cellulose	46.1	34.7	23.4	49.2

deutliche Abnahme, im Gegensatz zu den übrigen Analysen, die manchmal sogar ein Ansteigen des Alkohol-Benzol-Extraktes ergaben.

Die Ergebnisse der verschiedenen Analysen sind in Tabelle XVII bis XXII zusammengestellt.

Tabelle XIX.

Futterholz- und Kotanalyse von Leptura rubra, Fichtenholz.

	Futterholz %	Exkremente %	Exkremente reduzierter Wert	Exkremente Abnahme %
Alkohol-Benzol-Extrakt	3,2	4,7	3,4	—
Lignin	27,5	37,4	27,5	—
Gesamtpentosan	8,8	9,5	6,9	21,6
Orthopentosan	2,9	3,7	2,7	6,9
Hemipentosan	5,9	5,8	4,2	27,1
Glucosewert	21,8	22,6	16,5	24,3
Cellulose	48,0	41,2	33,9	32,8

Tabelle XX.

Futterholz- und Kotanalyse von Gracilia minuta, Weidenholz.

	Futterholz %	Exkremente %	Exkremente reduzierter Wert	Exkremente Abnahme %
Alkohol-Benzol-Extrakt	3,5	6,6	4,6	—
Lignin	20,4	29,4	20,4	—
Gesamtpentosan	16,3	18,7	13,0	25,1
Orthopentosan	5,1	5,3	3,7	27,5
Hemipentosan	11,2	13,4	9,3	17,0
Glucosewert	26,6	17,1	11,9	55,3
Cellulose	39,5	35,2	24,7	38,3

Tabelle XXI.

Futterholz- und Kotanalyse von Sirex gigas L., Tannenholz (Abies pectinata).

	Futterholz %	Exkremente %	Exkremente reduzierter Wert	Exkremente Abnahme %
Alkohol-Benzol-Extrakt	0,57	0,67	0,50	12,3
Lignin	28,5	32,8	28,5	—
Gesamtpentosan	10,1	10,7	8,8	12,9
Orthopentosan	2,5	2,4	2,1	16,0
Hemipentosan	7,6	8,3	7,2	5,3
Glucosewert	24,8	21,4	18,6	25,0
Cellulose	49,2	44,3	38,5	21,8

Tabelle XXII.

Futterholz- und Kotanalyse von Sirex phantoma Fabr.[1], Fichtenholz.

	Futterholz %	Exkremente %	Exkremente reduzierter Wert	Exkremente Abnahme %
Alkohol-Benzol-Extrakt	4,9	4,7	3,9	20,4
Lignin	33,7	40,2	33,7	—
Gesamtpentosan	11,4	10,4	8,7	23,7
Orthopentosan	—	—	—	—
Hemipentosan	—	—	—	—
Glucosewert	—	—	—	—
Cellulose	42,3	35,0	29,4	30,5

4. *Zusammenfassung.*

Durch vergleichende Futterholz- und Kotanalysen konnte bei allen untersuchten Arten eine deutliche Verdauung von Gerüstsubstanzen des Holzes festgestellt werden. Cellulose, Gesamtpentosan, Ortho- und

[1] Für die Bestimmung der aus dem Fraßstück geschlüpften Imagines sage ich Herrn Prof. Dr. *Leininger*, Karlsruhe, besten Dank.

Hemipentosan und der Glucosewert als Ausdruck des leicht hydrolysierbaren Anteils des Holzes zeigten in den Larvenexkrementen eine Abnahme. Die Ergebnisse bei *Anobiiden* und *Cerambyciden* bestätigen die Ergebnisse von *Falk* und *Ripper*. Für die *Siriciden* konnte erstmals der Beweis der Celluloseverdauung erbracht werden.

In der Holzverdauung von symbiontenführenden gegenuber symbiontenfreien Arten bestehen keine Unterschiede.

VII. Die Bedeutung der untersuchten Symbiosen.

An Hand der in den vorhergehenden Abschnitten gewonnenen Ergebnisse, soll nun versucht werden, die Hypothese *Buchner*s zu prufen. Von den untersuchten Symbiosen sind die *Hefe*-Symbiosen der *Anobiiden* und *Cerambyciden* in ihren Erscheinungsformen derart übereinstimmend, daß wir sie gemeinsam behandeln konnen, wahrend fur die völlig anders geartete *Siriciden*-Symbiose eine gesonderte Betrachtung notwendig ist.

1. Die Anobiiden- und Cerambycidensymbiose.

Unsere Überlegungen gruppieren sich im wesentlichen um folgende drei Fragen:

a) Haben die Symbionten im Wirtsorganismus eine nachweisbare Aufgabe zu erfullen?

b) Sind die symbiontischen Organismen fur die Tiere uberhaupt lebensnotwendig?

c) Kann man die Symbionten vielleicht als erbliche Parasiten betrachten?

a.

Wie wir im Abschnitt III gesehen haben, hat die Prufung der Eigenschaften der Symbionten in Reinkultur eigentlich nichts ergeben, was zur Deutung der Symbiose beitragen konnte. Irgendwelche Eigenschaften der Hefen, die fur die Verdauungsphysiologie der Wirte wesentlich in Frage kommen, waren nicht zu finden, weder Cellulosespaltung noch Luftstickstoffassimilation ließen sich nachweisen.

Diesem Ergebnis konnte entgegengehalten werden, daß es sehr wohl möglich ist, daß die Pilze in der kunstlichen Kultur diejenigen Eigenschaften verloren haben, die sie fur die Tiere bedeutungsvoll machen.

Weiterhin wurde eingehend gepruft, welche fermentativen Eigenschaften den von Symbionten bewohnten Darmabschnitten im Vergleich zu den übrigen Darmteilen zukommen. Irgendwelche Besonderheiten waren bei den Blindsacken nicht feststellbar. Die Versuche zeigten, daß die Blindsackregion keinerlei Bedeutung fur die Cellulaseproduktion hat. Andererseits ist Cellulase tatsachlich im Darm vorhanden; sie

wird vermutlich vom symbiontenfreien Mitteldarmepithel produziert (vgl. Abschnitt V).

Wollte man dennoch den Symbionten eine Beteiligung an der Verdauung zusprechen, so müßte man annehmen, daß sie nur ein Proferment (Zymogen) erzeugen, das sich erst im Darm mit dem vom Tier in anderen Darmabschnitten produzierten Aktivator zum wirksamen Enzym vereinigt (oder umgekehrt), etwa in der Weise, wie das Pankreas-Trypsinogen durch die Enterokinase aktiviert wird. Wenn dies zutrifft, müßte sich durch Zusatz von wenig Mitteldarmextrakt zum Blindsackextrakt eine erheblich gesteigerte Cellulasewirkung erzielen lassen. Bis jetzt ist von der Cellulase nicht bekannt, daß sie sich aus zwei Komponenten, Proferment und Aktivator, zusammensetzt. Außerdem ist es wenig wahrscheinlich, daß die an sich dem Tierkörper fremden Symbionten Erzeuger der einen Komponenten sind, während die Bildung der anderen das Tier selbst übernommen hat.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß nur die in das Darmlumen abgestoßenen Symbiontenzellen die Fähigkeit der Cellulaseproduktion besitzen. Dann müßten allerdings die Symbionten wahrscheinlich auch in Reinkultur das Cellulosespaltungsvermögen beibehalten, denn im Darmlumen stehen sie nicht mehr unter dem direkten Einfluß des tierischen Gewebes, und die Verhältnisse im Darminhalt unterscheiden sich von denen auf manchen künstlichen Substraten nicht sehr wesentlich.

Die Frage, ob den Symbionten im tierischen Organismus eine nachweisbare Aufgabe zufällt, müssen wir also dahin beantworten, daß es bis jetzt nicht gelungen ist, eine solche Beteiligung der Symbionten am Stoffwechsel im Tierkörper nachzuweisen, daß daraus für das Tier ein wesentlicher Nutzen entspringen könnte.

b.

Es ist also die Frage berechtigt, ob die Symbionten für das Tier überhaupt lebensnotwendig sind.

Schon *Buchner* und *Schwartz* schlugen vor, Symbiontenträger ohne Symbionten zu züchten und die eventuell auftretenden Ausfallerscheinungen zu beobachten. *Breitsprecher* (1928) versuchte durch Behandlung der Eier mit Desinfektionsmitteln *Sitodrepa*-Larven pilzfrei zu bekommen, doch ohne Erfolg. Durch die Untersuchungen von *Kiefer* (1932) wissen wir, daß durch Kälte und Nahrungsmangel bei *Anobiiden* und *Cerambyciden*-Larven die Symbiontenbesiedelung zurückgeht; niemals ließen sich aber durch Kälte und Hunger vollkommen symbiontenfreie Larven erzielen.

Neuerdings hat *Koch* (1933) bei *Sitodrepa panicea* die Infektion der schlüpfenden Larven durch Sterilisation der Eihüllen verhindert.

Die *Cerambyciden*-Larven verlieren unter bestimmten Umständen auf natürliche Weise ihre Blindsäcke. Die Imagines der Bockkäfer haben keine Darmanhänge; die Rückbildung der Blindsäcke müßte also bei der Anlage des imaginalen Darms vor sich gehen, d. h. kurz vor der Verpuppung. Bei den *Anobiiden* haben *Buchner* (1921) und *Breitsprecher* (1928) gefunden, daß bei der Anlage des imaginalen Darms die meisten Symbionten das Tier verlassen; nur wenige treten in das neue Darmepithel über und erzeugen die imaginalen Mycetocyten. In der alten Puppe verlassen ebenfalls wieder zahlreiche Hefen die Blindsäcke, um zur Füllung der Übertragungseinrichtungen verwendet zu werden.

Wie die Metamorphose bei den *Cerambyciden* vor sich geht, ist bis jetzt nicht bekannt. *Buchner* berichtet nur von einer blindsackfreien *Leptura*-Larve, die kurz vor der Verpuppung stand, und *Kiefer* fand bei älteren Larven von *Rhagium inquisitor* häufig rückgebildete oder überhaupt keine Blindsäcke.

Unter etwa 200 *Oxymirus*-Larven fand ich im Dezember und Januar zwei Tiere mit einem vollkommen glatten Darm; auch im Schnittpräparat waren weder Ausstülpungen noch Pilzzellen zu sehen. Die Tiere waren ganz normal und zeigten äußerlich keine Unterschiede gegenüber symbiontenfuhrenden Individuen; das Fettgewebe war normal entwickelt und der Darm prall mit Nahrung gefüllt. Das Material war im Oktober gesammelt; die Tiere fraßen im Laboratorium den ganzen Winter hindurch weiter. Unter natürlichen Verhältnissen wird im Winter selbstverständlich die Nahrungsaufnahme eingestellt, und der Darminhalt besteht dann im wesentlichen nur aus Flüssigkeit. Im Herbst und Winter habe ich von *Oxymirus* im Freien nie Puppen gefunden, sondern nur im Sommer. Es ist also anzunehmen, daß die beiden blindsackfreien Larven sich frühestens im folgenden Frühjahr verpuppt hätten. Obgleich ihre Blindsäcke sich schon rückgebildet hatten, waren die Därme noch mit Nahrung gefüllt. Der Verlust der Blindsäcke muß also keineswegs mit der Einstellung der Nahrungsaufnahme verbunden sein. Es ist also möglich, daß bei den *Cerambyciden* die larvalen Blindsäcke schon einige Zeit vor der Anlage des imaginalen Darms verschwinden. Ziehen wir einen Vergleich zu den Verhältnissen bei den *Anobiiden*, so ist es ungeklart, woher die *Cerambyciden*-Imagines die Pilze zur Füllung der Übertragungseinrichtungen beziehen. Weitere Studien müssen hier Klarheit schaffen.

Auch bei *Rhagium bifasciatum* konnte ich im Frühjahr einzelne Larven ohne Blindsäcke beobachten· auch sie hatten einen gefüllten Darm.

Aus diesen Beobachtungen und aus den Berichten von *Buchner* und *Kiefer* geht also hervor, daß bei *Cerambyciden*-Larven die letzte

Phase des Larvenstadiums, deren Dauer nicht unterschätzt werden darf, in symbiontenfreiem Zustande verläuft, obwohl die Nahrungsaufnahme noch nicht eingestellt zu sein scheint.

Andererseits ist es immerhin möglich, daß die Infektion der Junglarven unterbleiben kann, vielleicht dadurch, daß sich gelegentlich die Intersegmentalschläuche des Mutterkäfers nicht füllen. So hat *Heitz* bei Weibchen von *Leptura rubra*, die im Laboratorium frisch geschlüpft waren, pilzfreie Übertragungseinrichtungen beobachtet. In solchen Fällen findet das Einwandern der im Nährsubstrat wohl immer reichlich vorhandenen Symbionten in das larvale Darmepithel wahrscheinlich erst später statt, wie es *Breitsprecher* bei *Sitodrepa* feststellte; vielleicht kann die Infektion auch ganz unterbleiben. *Buchner* und *Kiefer* sind der Meinung, daß symbiontenfreie Larven, soweit es sich nicht um alte, verpuppungsreife Tiere handelt, nicht vorkommen. Dagegen muß gesagt werden, was auch *Kiefer* betont, daß die Größe der Larven keinen Anhaltspunkt für das Alter gibt, man also nie weiß, ob es sich auch wirklich um eine alte Larve handelt, wenn sie keine Blindsäcke besitzt.

Nach dem heutigen Stande unserer Kenntnisse ist unter den *Anobiiden* mit Sicherheit keine Art bekannt, bei der die Symbiose fehlt. *Breitsprecher* fand bei einigen Formen (*Hedobia imperialis*, *Ptilinius pecticornis*, *Xyletinus ater*) an trockenem Sammlungsmaterial zwar keine auf irgendwelche Symbiose deutenden Erscheinungen, doch sind diese Befunde nicht beweisend. Dagegen wissen wir, daß unter den *Cerambyciden* eine große Anzahl von Arten keine Hefe-Symbiose besitzt. *Buchner* läßt die Möglichkeit offen, daß in diesen Fällen vielleicht eine versteckte Symbiose anderer Art vorliegt. Symbiosen sind bis jetzt nur in der Unterfamilie der *Cerambycinae* nachgewiesen, während die *Lamiinae* stets frei von Pilzen waren. Von den *Cerambycinae* sind es die Gattungen *Rhagium*, *Oxymirus*, *Leptura* und *Spondylis*, deren Larven symbiontengefüllte Blindsäcke besitzen. Bei einer Reihe weiterer Arten hat *Buchner* an trockenem Sammlungsmaterial in den Intersegmentalschläuchen der weiblichen Käfer *Hefen* festgestellt. Trotzdem bleibt noch ein beträchtlicher Rest von Formen und darunter gerade unsere größten Bockkäferarten, deren Larven am Darm keine Spur von Mycetocyten besitzen. *Ripper* hat die Larve von *Cerambyx cerdo* genau geprüft und nichts gefunden, was auf eine Symbiose hingewiesen hätte. Ich untersuchte die Larven von *Prionus coriarius*, *Cerambyx cerdo*, *Gracilia minuta* und *Callidium spec.* (aus Erle), ohne Symbionten zu finden.

Durch die Untersuchungen *Ripper*s wissen wir, daß das Vorkommen einer Cellulase keineswegs an das Vorhandensein von Symbionten gebunden ist. Ich konnte bestätigen, daß auch symbionten-

freie Arten Cellulase erzeugen (Abschnitt V), und daß der Abbau der Holzsubstanz im Darm in derselben Weise vor sich geht wie bei Formen mit Symbiose (Abschnitt VI). Auch in einem *Oxymirus*-Darm ohne Blindsäcke war Cellulase vorhanden. Xylanase, die ich bei *Oxymirus* nachwies, hat *Seillière* (1901) bei dem symbiontenfreien *Phymatodes variabilis* gefunden.

Betrachten wir die Lebensweise verschiedener *Cerambyciden*-Arten, so treffen wir neben ausgesprochenen Holzfressern zahlreiche Formen an, die meist das ganze Larvenleben (*Rhagium*-Arten) oder seinen größten Teil (*Callidium*-Arten) unter der Rinde verbringen, sich also von Rinde und Bast ernähren, einem Material, das wesentlich cellulose-ärmer, dafür aber eiweißreicher ist als Holz. Das Vorkommen einer Symbiose ist jedoch keineswegs an die Formen mit ausgesprochener Holznahrung gebunden, sondern es finden sich in beiden Gruppen Arten mit und ohne Symbionten; Cellulase aber kommt allgemein bei allen bis jetzt geprüften Arten vor.

Trotz aller dieser Einwände bleibt noch die Möglichkeit, daß die symbiontenführenden Formen irgendwie durch eine Zusatzleistung der Symbionten gegenuber den symbiontenfreien Arten in ihrer Leistungsfähigkeit gefördert sind. Es ist wohl angängig, daß bei zwei so nahe verwandten Formen wie *Cerambyx cerdo* und *Cerambyx scopolii*, die sich in morphologischer und ökologischer Hinsicht sehr nahestehen, die Körpergröße bis zu einem gewissen Grade als Ausdruck der physiologischen Leistungsfähigkeit betrachtet werden darf. Wenn die Symbiose eine Leistungsteigerung ermöglichen würde, müßte *Cerambyx scopolii* als Symbiontentrager (*Buchner*) physiologisch besser gestellt sein. In Wirklichkeit zeigt sich jedoch gerade umgekehrt, daß der symbiontenführende *Cerambyx scopolii* von dem symbiontenfreien *Cerambyx cerdo* an Große um ein Mehrfaches ubertroffen wird.

Wir können also mit Sicherheit annehmen, daß durch die Symbiose die Celluloseverdauung weder bedingt noch gefördert wird. Nach den Befunden *Koch*s (1933 a) an der omnivoren *Sitodrepa panicea* scheint die Symbiose doch eine Bedeutung für das Tier zu haben, da sterile Larven nur sehr kümmerliches Wachstum zeigten. *Koch* läßt die Frage offen, ob die Symbionten Nährstofflieferanten oder eine Vitaminquelle für den tierischen Organismus sind. Das erste ist wenig wahrscheinlich, da keine Verdauung der Pilze nachweisbar ist. Das zweite erscheint zunächst fraglich, da man doch annehmen sollte, daß gerade die omnivore Sitodrepa genügend Vitamine mit der Nahrung aufnimmt. Dagegen berichten *Buchner* (1932/33) und *Aschner* und *Ries* (1933), daß nach *Koch* bei dem ebenfalls omnivoren *Oryzaephilus surinamensis* nach Symbiontenverlust keine Ausfällserscheinungen auftreten.

c.

Nachdem es also nicht gelungen ist nachzuweisen, daß den Blindsackbewohnern eine Bedeutung für den tierischen Stoffwechsel zukommt, und die Pilze für die Tiere nicht lebensnotwendig zu sein scheinen, ein gegenseitiger Nutzen im Sinne einer Symbiose also nicht vorliegt, bleibt die Möglichkeit, die Symbionten als erbliche Parasiten zu betrachten, die mit großer Regelmäßigkeit von Generation zu Generation übertragen werden.

Da sich zwischen Symbiose und Parasitismus keine scharfe Grenze ziehen läßt, ist diese Entscheidung äußerst schwer zu treffen. Bei Symbiosen scheint ja häufig einer der Partner das Übergewicht zu erlangen und zum Parasiten zu werden. *Schwartz* (1932) hat bei *Lecaniinen* in älteren Tieren eine übermäßig starke Vermehrung der Symbionten beobachtet. Durch die Blindsackorganismen hervorgerufene Schädigungen hat man jedoch bei *Anobiiden* und *Cerambyciden* bisher nicht festgestellt.

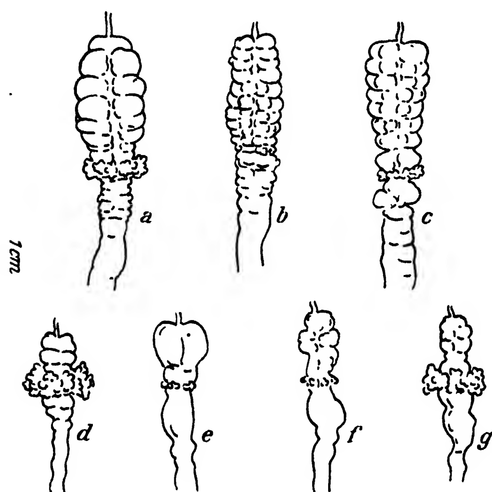


Abb. 31.
Vordere Darmabschnitte von *Rhagium bifasciatum*-Larven mit verschieden großen Blindsäcken. Larven a bis c 25 mm, d bis g 15 bis 18 mm lang. Die Larven wurden am 12. Mai 1931 aus demselben Baumstumpf gesammelt.

Bei Larven von *Rhagium*-Arten sind die Blindsäcke sehr ungleich entwickelt. *Kiefer* (1932) fand bei *Rhagium inquisitor* neben dem Normaltyp, mit kleinen durch Abstände getrennten Blindsäcken, Larven mit sehr großen Darmorganen, die als traubige Säcke den Darm umschlossen, etwa in der Weise wie bei *Leptura*. Ähnliche Beobachtungen machte ich bei Larven von *Rhagium bifasciatum* (Abb. 31). Auch hier waren die Unterschiede in der Größe der Darmanhänge sehr auffällig. Tiere mit „hypertrophierten“ Blindsäcken traten ausschließlich im Frühjahr auf. Diese Vorkommnisse erwecken den Anschein, daß unter bestimmten Umständen in bestimmt disponierten Larven die Symbionten ihre Sprossungstätigkeit wesentlich steigern und die Blindsäcke zu übermäßiger Entwicklung anregen.

Durch die Annahme eines erblichen Parasitismus würden die zweckmäßigen, symbiontischen Einrichtungen unverständlich werden. Man könnte sich allerdings die Entstehung der Blindsäcke als eine Art Gallenbildung denken (*Ripper*). Von *Buchner* wurde nachgewiesen, daß bei Junglarven von *Anobiiden* erst durch Eindringen der Hefen ins Darmepithel die Zellen zur Bildung der Aussackungen angeregt werden. Dagegen berichtet *Breitsprecher* von jungen *Sitodrepa*-Larven, deren Infektion in der Regel in der ersten Woche stattfindet, daß sich das Einwandern der Pilze ins Darmepithel in manchen Fällen um 2 bis 3 Wochen verzögert hat. Bei diesen spät infizierten Tieren bildeten sich vor der Einwanderung der Hefe im vorderen Teile des Mitteldarmes kleine Ausbuchtungen, die manchmal das Aussehen richtiger Blindsäcke annahmen. Die Zellen dieser Bildungen hatten einen Stäbchensaum, wie er für „sterile" Zellen typisch ist, der erst mit der Infektion verschwand. *Breitsprecher* gibt zwei Erklärungen für diese Erscheinung: entweder besaßen die symbiontenfreien Vorfahren von *Sitodrepa* auch schon Darmblindsäcke, oder die erst durch die Symbiose erzeugten Anhangsorgane sind schon erblicher Besitz des Tieres geworden. Doch sind wir hier nur auf Vermutungen angewiesen.

Buchners Hauptargument für die Zweckmaßigkeit der *Anobiiden*- und *Cerambyciden*-Symbiose ist das Vorhandensein der Übertragungseinrichtungen, die die Erhaltung der Symbiose gewährleisten sollen. Wenn die intersegmentalen Organe echte Symbioseeinrichtungen sind, d. h. sich erst unter dem Einfluß der Symbiose gebildet haben, dürfen die symbiontenfreien *Cerambyciden*-Arten keine solchen Organe besitzen. Das ist aber nicht so; die Intersegmentalschläuche sind auch bei vielen symbiontenfreien Arten zu finden, vielleicht bei allen. *Buchner* berichtet, daß in diesen Fallen die intersegmentalen Einstulpungen, die immer ein Drüsenpolster tragen, maßig entwickelt und hefefrei sind. Dies führt zu dem Schluß, daß die fraglichen Schläuche keine ursprünglichen Symbiontenorgane sind, sondern vielleicht nur Drüsenorgane mit gewissen sekretorischen Funktionen, wenn man nicht annehmen will, daß die symbiontenfreien Formen erst sekundär ihre Symbiose verloren haben und jetzt allein auskommen, was die Symbiose entbehrlich erscheinen ließe. Es wäre denkbar, daß die Hefen, als die Symbiose entstand, die schlauchförmigen Organe am Darmscheidenrohr vorfanden und sich dann darin ansiedelten. Was man von den *Cerambyciden* mit einiger Sicherheit sagen kann, wird damit für die *Anobiiden* wahrscheinlich, da die beiden Familien bezüglich ihrer symbiontischen Einrichtungen weitgehend übereinstimmen.

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, wie die Füllung der Intersegmentalschläuche vor sich geht. *Breitsprecher* denkt sich bei den *Anobiiden* den Vorgang so: Die beim jungen Imago reichlich

ins Darmlumen ausgetretenen Hefen gelangen durch den Darmkanal in den Scheidenraum; dann werden durch peristaltische Kontraktionen des Legeapparates die Zellen im Darmscheidenrohr emporgehoben, so daß schließlich einige Zellen in die Schläuche gelangen.

Es ist nicht notwendig, eine zweckhafte Mitwirkung des Tieres bei der Füllung der Schläuche anzunehmen. Die normale Peristaltik dürfte genügen, die Hefen an den Eingang der Schläuche zu bringen. Hier finden sie im Sekret Nahrung und vermehren sich intensiv[1]. Es entsteht dann das Bild der Beschmierdrüse, die nun bei jeder Kontraktion Zellen ausstößt.

Für die Übertragungseinrichtungen sind also beide Deutungen — zweckmäßige Einrichtung oder regelmaßige parasitische Besiedelung schon vor der Symbiose vorhandener Organe — zulässig.

Da eine Zweckmaßigkeit der *Anobiiden*- und *Cerambyciden*-Symbiose nicht nachweisbar war, und auch die Deutung der Übertragungseinrichtungen als spezifische symbiontische Einrichtung nicht zwingend ist, ist eigentlich die Bezeichnung Symbiose im engeren Sinne nicht mehr zulässig. Ein offenkundiger Parasitismus liegt jedoch ebensowenig vor. Es scheint, daß ein Kampf zwischen Wirt und „Symbiont" stattfindet; gelegentliche Störungen des symbiontischen Gleichgewichts deuten darauf hin. In der dauernden Ausstoßung von Symbionten aus den Mycetocyten dürfen wir vielleicht den regulierenden Einfluß des Tieres erblicken.

Daß praktisch niemals „sterile" Individuen innerhalb einer symbiontenführenden Art gefunden werden, ist kein Beweis für die Unentbehrlichkeit der Symbiose. Wir kennen eine ganze Reihe harmloser Bewohner des Tierkörpers, die auch mit großer Regelmäßigkeit auftreten, ohne daß dabei an eine Symbiose gedacht wird.

Da wir jede Symbiose aus einer zufälligen parasitischen Besiedelung herleiten müssen, ist es denkbar, daß die relativ junge *Anobiiden*- und *Cerambyciden*-Symbiose (*Buchner*) sich in einem Übergangsstadium zwischen reinem Parasitismus und Symbiose befindet. *Koch* hat in einer soeben erschienenen Arbeit (1933b) neue Versuche mit symbiontenfreier *Sitodrepa panicea* mitgeteilt, deren Ergebnisse für eine Lieferung von Erganzungsstoffen durch die Symbionten zu sprechen scheinen[2]. Solange nicht auch bei den hier behandelten Arten durch Sprengung der Symbiose und Beobachtung von Ausfallerscheinungen das Gegenteil festgestellt ist, dürfen wir wohl annehmen, daß die Symbionten weitgehend an den tierischen Organismus angepaßte Kommensalen sind, denen eine Aufgabe im Tierkörper nicht zukommt.

[1] *Breitsprecher* hat in den Intersegmentalschläuchen von *Sitodrepa* reichlich Sprossungsstadien gefunden. — [2] Zusatz bei der Korrektur.

2. Die Siriciden-Symbiose.

Unsere Kenntnisse über die *Siriciden*-Symbiose sind so gering, daß sich über die physiologischen Verhältnisse in der Symbiose kaum etwas aussagen läßt.

Celluloseverdauung findet bei den *Siriciden* in derselben Weise statt wie bei *Anobiiden* und *Cerambyciden*. Ob allerdings die Holzverdauung durch tiereigene Fermente ermöglicht wird, oder ob die symbiontischen Pilze die Cellulase produzieren, läßt sich noch nicht entscheiden.

Da der *Sirex*-Pilz in Kultur reine Cellulose als C-Quelle nicht verwerten kann (Abschnitt III), ist es unwahrscheinlich, daß er für das Tier eine Hilfe bei der Celluloseverdauung darstellt. Dieses Ergebnis ist einigermaßen überraschend, da beim *Sirex*-Symbionten als *Basidiomyceten* am ehesten noch die Möglichkeit bestand, daß er am Celluloseabbau beteiligt ist.

Buchner (1927) bringt die *Siriciden* mit den *Ambrosia*-Züchtern in Zusammenhang. Man kann indessen kaum annehmen, daß sich in dem engen, der Larve zur Verfügung stehenden Raum ein Pilzrasen nach Art der *Ambrosiapilze* entwickelt. Es wurden auch niemals in den Fraßgängen großere Mycelien beobachtet, auch im Holz in der Nachbarschaft der Gänge finden sich höchstens vereinzelt Pilzfäden. Das Holz zeigt keinerlei Zersetzungserscheinungen, ist auch nicht verfärbt wie bei den ubrigen Pilzzüchtern.

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1931 und 1932 im Botanischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe ausgeführt. Herrn Privatdozent Dr. *W. Schwartz* sage ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und für die Anregung und Forderung, die er mir zuteil werden ließ, meinen besten Dank. Ferner danke ich Herrn Professor Dr. *L. Jost*, Heidelberg, für das rege Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte. Herrn Prof. Dr. *Buchner*, Breslau, bin ich fur Überlassung von Literatur zu Dank verpflichtet.

VIII. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Symbionten von *Ernobius abietis* und *mollis*, *Rhagium bifasciatum*, *inquisitor* und *mordax*, *Leptura rubra* und *Sirex gigas* konnten in Kultur genommen werden.

2. Die Symbionten von *Xestobium rufovillosum*, *Anobium striatum*, *Dendrobium pertinax* und *Oxymirus cursor* erwiesen sich als nicht kultivierbar.

3. Bei den *Ernobius*-Symbionten stimmten Kulturform und Symbioseform weitgehend überein.

4. Die *Rhagium*-Symbionten ändern bei Kultur auf künstlichen Substraten ihre Form. Durch Kultur in der Lymphe lebender Insekten gelingt es, die Kulturform wieder in die Symbioseform überzuführen.

5. Die Symbionten der *Anobiiden* und *Cerambyciden* behalten auch in der Kultur ihren *Hefe*-Charakter bei. Es kommt höchstens zur Schlauchbildung und zur Entstehung von „Sproßkonidien" an den Schläuchen. Da Sporenbildung fehlt, müssen die kultivierten Hefen vorerst zu den *Pseudosaccharomyceten* gestellt werden.

6. Der *Sirex*-Pilz liegt in der Symbiose, soweit sie uns bekannt ist, in Oidienform vor. In Kultur bildet er ein typisches *Basidiomyceten*-Mycel. Fruchtkörper traten in der Kultur bis jetzt nicht auf.

7. Prüfung der Fermentbildung und des ernährungsphysiologischen Verhaltens ergaben bei den Reinkulturen der symbiontischen Hefen keinerlei Anhaltspunkte für das Vorhandensein von Eigenschaften, die für die Ernährung des Wirtes von Bedeutung sein könnten. Celluloseabbau und Stickstoffbindung ließen sich nicht nachweisen.

8. Der *Sirex*-Symbiont gedeiht nicht mit Cellulose als einziger Kohlenstoffquelle.

9. Bei den symbiontenführenden *Anobiiden* und *Cerambyciden* lassen sich — soweit Prüfungen vorgenommen werden konnten — im Darmlumen Symbionten nachweisen, die vermutlich aus den Mycetocyten stammen.

10. Bei *Ernobius* und *Leptura* ließen sich Symbiontenkulturen aus dem Darminhalt, teilweise auch aus dem Fraßmehl gewinnen.

11. In der Darmflora, Fraßmehlflora und Außenflora der *Anobiiden* und *Cerambyciden* fanden sich in der Hauptsache *Hefen* und grüne *Penicillien*.

12. Im Larvendarm der *Cerambyciden* gelingt der Nachweis eines cellulosespaltenden Ferments. In den symbiontenführenden Blindsäcken ist Cellulase jedoch höchstens in Spuren nachweisbar, wird also dort nicht erzeugt. Auch symbiontenfreie Arten enthalten Cellulase.

13. Vergleichende Futterholz- und Kotanalysen erbrachten bei symbiontenführenden und symbiontenfreien Arten ebenfalls den Nachweis, daß die Gerüstsubstanzen des Holzes (außer Lignin) abgebaut werden.

14. Die Annahme *Buchners*, daß die Holzverdauung mit Hilfe der Symbionten durchgeführt wird, läßt sich für die *Anobiiden* und *Cerambyciden* nicht aufrecht erhalten.

15. Die Deutung der Übertragungseinrichtungen bei weiblichen Imagines (Pilzspritzen) als spezifische, in der Symbiose entstandene Organe ist nicht zwingend.

16. Solange nicht bei steriler Aufzucht Störungserscheinungen beobachtet worden sind, ist man gezwungen, die Symbiose der holzbewohnenden *Anobiiden* und *Cerambyciden* als sehr gemäßigten, regelmäßig vorhandenen erblichen Parasitismus zu betrachten.

17. Eine Deutung der *Siriciden*-Symbiose ist noch nicht möglich. Das Bestehen einer Pilzzucht wie bei den *Ambrosia*käfern ist wenig wahrscheinlich.

IX. Literatur.

Aschner, M., Experimentelle Untersuchungen über die Symbiose der Kleiderlaus. Naturwiss. **20**, 501, 1932. — *Aschner, M.* u. *Ries, E.*, Das Verhalten der Kleiderlaus bei Ausschaltung ihrer Symbionten. Zeitschr. f. Morphol. u. Ökol. d. Tiere **26**, 529, 1933.

Belehradek, I., Experience sur la cellulase et amylase de la salive chez Dixippus morosus. Arch. Intern. Physiol. **17**, 260, 1922. — *Biedermann, W.*, Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. 8. Die Verdauung des pflanzlichen Zellinhaltes im Darm der Insekten. Arch. d. ges. Physiol. **174**, 1919. — *Biedermann, W.* u. *Moritz, P.*, Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung. 2. Helix pomatia. Pflügers Arch. d. ges. Physiol. **78**, 1898. — *Bierry, H.* u. *Giaja, J.*, Untersuchungen über Mannane, Galaktane und Cellulose angreifende Enzyme. Biochem. Zeitschr. **40**, 370, 1914; Soc. Biol. **77**, 2, 1911. — *Breitsprecher, E.*, Beiträge zur Kenntnis der Anobiidensymbiose. Zeitschr. f. Morph. u. Ökol. d. Tiere **11**, 495, 1928. — *P. Buchner*, Studien an intracellularen Symbionten. 3. Die Symbiose der Anobiinen mit Hefepilzen. Arch. Protistenk. **4**, 42, 1921. — *Derselbe*, Holznahrung und Symbiose. Forschungen u. Fortschritte **3**, 1927. — *Derselbe*, Tier und Pflanzen in Symbiose. Berlin 1930. — *Derselbe*, Der gegenwärtige Stand der neuen Symbioseforschung, Biologe **2**, 1, 1932/33.

Campbell, W. G., The Chemical Aspect of the Destruction on Oak Wood by Powder Post and Death Watch Beetles. Lyctus spec. and Xestobium spec. Biochem. J. **23**, 1290, 1929. — *Cleveland, L. R.*, Symbiosis among Animals with Special Reference to Termites and their intestinal Flagellates. Dep. of Tropical med. Harward Univ., Med. School Boston Quart. Rev. of Biol. **1**, 1926. — *Derselbe*, Further Observations and Experiments on the Symbiosis between Termites and their Intestinal Protozoa. Biological Bull. **54**, 1928.

Ekblom, T., Cytological and biochemical researches into the intracellular symbiosis in the intestinal cells of Rhagium inquisitor L. Skand. Arch. f. Physiol. **61**, 35, 1931. — *Escherich, K.*, Über das regelmäßige Vorkommen von Sproßpilzen in dem Darmepithel eines Käfers. Biol. Zentralbl. **20**, 1900. — *Derselbe*, Die Forstinsekten Mitteleuropas. Berlin 1923.

Falk, R., Die Scheindestruktion des Koniferenholzes durch die Larven des Hausbockes, Hylotrupes bajulus. Cellulosechem. **11**, 89, 1930. — *Derselbe*, Scheindestruktion des Holzes durch die Larve von Anobium. Ebenda **11**, 125, 1930.

Grossmann, H., Beiträge zur Kenntnis der Lebensgemeinschaft zwischen Borkenkäfern und Pilzen. Zeitschr. f. Parasitenkde. **3**, 56, 1930.

Hering, M., Biologie der Schmetterlinge. Berlin 1929. — *Hess, K.*, Die Chemie der Cellulose und ihrer Begleiter. Leipzig 1928. — *Heitz, E.*, Über intracelluläre Symbiose bei holzfressenden Käferlarven. I. Zeitschr. f. Morph. u. Ökol. d. Tiere **7**, 279, 1927.

Karawaiew, W., Über Anatomie und Metamorphose des Darmkanals der Larve von Anobium paniceum. Biol. Zentralbl. **19**, 1899. — *Karrer, P.*, *Staub, M.* u. *Joos, B.*, Polysaccharide. XXI. Helvet. chim. Acta **7**, 800, 1924. — *Karrer, P.* u. *Illing, H.*, Polysaccharide. XXII. Ebenda **8**, 245, 1925. — *Karrer, P.*, *Schuberth, P.* u. *Wehrli, W.*, Polysaccharide. XXIII. Ebenda **8**, 797, 1925. — *Kiefer, H.*, Einfluß von Kälte und Hunger auf die Symbionten der Anobiiden- und Cerambycidenlarven. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **86**, 260, 1932. — *Klein, G.*, Handbuch der Pflanzenanalyse. Berlin 1932. — *Klöcker, A.*, Die Gärungsorganismen. Berlin und Wien 1924. — *Koch, A.*, Über das Verhalten symbiontenfreier Sitodrepalarven. Biol. Zentralbl. **53**, 199, 1933 (a). — *Derselbe*, Über künstlich symbiontenfrei gemachte Insekten. Verh. d. Deutsch. Zool. Ges. 1933 (b), S. 143. — *König, J.* u. *Becker, E.*, Die Bestandteile des Holzes und ihre wirtschaftliche Bedeutung. Zeitschr. f. angew. Chem. **32**, 156, 1919, Aufsatzteil.

Lehmann, O., Die quantitative Erfassung kleinster Mengen biologisch wichtiger Zuckerarten unter Ausschluß reduzierender nicht kohlenhydratartiger Körper. Planta **13**, 575, 1931.

Nüsslin, O., Leitfaden der Forstinsektenkunde. Berlin 1905.

Oppenheimer, C., Die Fermente und ihre Wirkungen **1**, Leipzig 1925.

Pregl, F., Die quantitative organische Mikroanalyse. Berlin 1930.

Ripper, W., Zur Frage des Celluloseabbaues bei der Holzverdauung xylophager Insektenlarven. Zeitschr. f. vergl. Physiol. **13**, 314, 1930. — *Rona, P.*, Praktikum der physiologischen Chemie, 1. Teil: Fermentmethoden. Berlin 1928.

Schober, B., Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei Aspergillus niger. Jahrb. f. wiss. Bot. **72**, 1, 1930. — *Schröder, M.*, Zur Frage der Assimilation des Luftstickstoffs durch Aspergillus niger. Jahrb. f. wiss. Bot. **75**, 377, 1932 — *Schwalbe-Sieber*, Die chemische Betriebskontrolle der Zellstoff- und Papierindustrie. Berlin 1928. — *Schwartz, W.*, Untersuchungen über die Pilzsymbiose der Schildläuse. Biol. Zentralbl. **44**, 1924. — *Derselbe*, Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. II. Neue Untersuchungen über die Pilzsymbiose der Schildläuse (Lecaniinen). Diese Zeitschr. **3**, 453, 1932. — *Seillière, M. G.*, Sur une diastase hydrolysant la xylane dans le tube digestif de certaines larves de Coleoptères. C. R. de la Soc. Biol. **58**, 940, 1905. — *Derselbe*, Hydrol. diast. de la Cellulose du Coton. Ebenda **61**, 205, 1906; **63**, 515, 1907; **68**, 107, 989, 1910. — *Stelling-Decker, N. M.*, Die Hefesammlung des Zentralbureau voor Schimmelkultures. I. Teil: Die sporogenen Hefen. Amsterdam 1931.

Werner, I., Die Ernährung der Larve von Potosia cuprea Fbr. (Cetonia floricola Hbst.). Ein Beitrag zum Problem der Celluloseverdauung bei den Insektenlarven. Zeitschr. f. Morph. u. Ökol. d. Tiere **6**, 150, 1925. — *Derselbe*, Der Erreger der Celluloseverdauung bei der Rosenkäferlarve (Potosia cuprea Fbr.), Bacillus cellulosam fermentans n. sp. Centralbl. f. Bakt. II. Abt., **67**, 297, 1926. — *Wiedemann, J. F.*, Die Celluloseverdauung bei Lamellikorniorlarven. Zeitschr. f. Morph. u. Ökol. d. Tiere **19**, 228, 1930. — *Wigglesworth, V. B.*, Digestion in the Cockroach. I. The Hydrogenionconcentration in the alimentary canal. Biochem. J. **21**, 799, 1927. — *Derselbe*, Digestion in the Cockroach. II. The Digestion ot Carbohydrates. Ebenda **21**, 797, 1927a. — *Derselbe*, Digestion in the Cockroach. III. The Digestion of Proteins and Fats. Ebenda **22**, 150, 1928. — *Wohlgemut, J.*, Grundriß der Fermentmethoden. Berlin 1913.

Zikes, H., Über eine den Luftstickstoff assimilierende Hefe: Torula Wiesneri. Sitzungsber. d. Wiener Akad. d. Wiss., math.-naturw. Kl. **18**, 118, Abt. I, 1909.

A soil chamber as a method for the microscopic study of the soil microflora.

By

N. G. Cholodny (Kiew.)

With 4 figures in the text.

(Eingegangen am 12. September 1933.)

I.

The new methods for studying soil bacteria, proposed not long ago by *Winogradsky*, and a series of excellent investigations on nitrogen-fixing, cellulose-decomposing, nitrifying and other soil microorganisms, published recently by the same author, begin doubtless a new era in the history of the soil microbiology. The best proof of the exceptional effectiveness of these methods is the fact, that they enabled *Winogradsky* to discover a number of new species of soil bacteria, which were unknown till now despite their very distinct morphological and physiological characters.

The new *Winogradsky* methods, designed for the isolation and study of definite physiological groups of soil microorganisms, are based on the same principle of elective culture, which was the base of old, now classical methods for accumulation, isolation and study of the soil microbes. The chief difference of the new technic consists in avoiding from the first liquid nutritive media as creating quite unnatural conditions for the population of typical well aerated soils. All the work from the moment of inoculating soil particles is conducted on solid plates. By this means not only is attained an approximation to the natural conditions, existing in soil, but also the long procedure of search and isolation of such microorganisms, as are of interest to the investigator, is simplified and abbreviated.

Of great significance is also the s. c. "direct method" of the microscopic study of the bacteria in soil, proposed originally by *Conn*, further developed by *Winogradsky* and afterwards perfected by other investigators. This method gives us a pretty clear idea on the density and character of the microbial population of soil. However the writer has lately shown, that the "direct method", owing to rather elaborate treatment of soil samples, mechanically divided in separate phases, alters considerably the natural physiognomy of the soil microflora, destroying its specific biocoenoses (*Cholodny* 1930).

Therefore the writer proposed in the same work as a supplement to the direct method of soil bacterioscopy the new technic of "soil slides", which consists in making a vertical incision in the soil and firmly inserting therein a clean object slide. The soil solution covers soon the surface of the buried slide; different colloid particles adhere to it and successively there develops a more or less abundant microflora, consisting of microorganisms, characteristic for the soil under investigation. After 7—14 days the slide is carefully taken out, so as not to disturb the thin film covering its surface and containing microbes; then it is dried, fixed and stained with

phenolic erythrosin. The preparation obtained represents rather well and completely the variety of organisms, inhabiting the soil under investigation, their natural distribution, the characteristic colony formations, predominant groups, some of their mutual relations etc. An important application of this method is also in studying the effect of the addition of different mineral and organic substances and of other soil treatment upon the microflora. The method of buried slides can undoubtedly help us by many investigations on soil microbiology. The value of it is now recognized by some prominent bacteriologists (*Rippel* 1932, *Conn* 1932, *Demeter* 1933).

It is hardly necessary to state, that the method of soil slides in no way pretends to supersede other bacterioscopic methods, particularly those designed for counting microorganisms, though attempts were made to use it also for this purpose (*Rossi* 1933). The most essential defect of the soil slide procedure consists, however, not therein, that it is little adapted for quantitative investigations. The criticism can be raised against this technic that it only for a short moment lifts the curtain, which covers the mysterious life of soil microorganisms, and that preparations, obtained by this method, are, so to say, merely instant photographs, giving exact but immovable pictures of microbial life in a certain moment of its development. In other words the method of buried slides, as also all bacterioscopic methods known up to now, do not enable us to perform *continuous* observations on the life of soil microflora, to study directly under the microscope manifold manifestations of its complex dynamics, noting step by step various phenomena, due to movements of microorganisms, their propagation, development, gradual metabiotic superseding of morphologically different forms etc.

Undoubtedly, had we discovered a method to perform such continuous and systematical observations on the soil microflora (and microfauna) *in its live condition*, it would be much more valuable for studying the soil life, than the method of buried slides. Of course, its value would be still greater, would it make possible to isolate any one or some soil microorganisms by choice and to transfer them as pure cultures on nutritive media for further observations and physiological experiments.

Considering all this, the writer tried to work out a method, that would fulfill, at least partly, the above mentioned conditions. The starting point of these attempts were some observations, made on soil slides under the microscope. As it has been already stated in the previous work (*Cholodny* 1930), the microorganisms are very unevenly distributed on the surface of these slides. A large number of them is concentrated in the soil conglomerates, i. e. small bits of soil, adhering to the glass and consisting of various mineral and organic remains, cemented by swollen colloid substances. These microorganisms are, of course, but little accessible to microscopic investigation. Another, no less con-

siderable part of microbial population of the slide is distributed on its clean surface at comparatively small distances to the soil particles, forming colonies of different shape and size. These are mostly *bacteria*. Still further grow *fungi* (and partly *actinomycetes*), whose hyphae often cross large parts of the slide surface, free from other microorganisms. These hyphae especially after their dying off, serve as highways for bacteria, which invade by this means larger and larger areas of the previously sterile territory.

It is clear, that the clean, i. e. free from soil particles surface of the glass, gradually taken by different soil microorganisms, corresponds to small hollows, i. e. such places, where the particles of soil do not lie close to the slide surface.

Therefore a number of microorganisms can, evidently, live and propagate inside these small soil hollows, using glass as a substratum, which, owing to its smooth surface, presents the least resistance to the growth of fungal hyphae and bacterial colonies, to the movement of *Protozoa* etc. The water, which constantly covers the surface of the slide, buried in soil, considerably facilitates these phenomena. Different substances, contained in soil, diffuse in this water and are a source of nutrition for most microorganisms inhabiting the hollows.

Now let us assume, that instead of a great quantity of soil, in which the object slide is buried, we have a comparatively small quantity of it, distributed as a thin layer of equal thickness between the object and cover slides. In this layer there may happen small hollows near the surface of both slides. Let us further assume, that one of these hollows has a depth equal to the thickness of the whole soil layer, from the cover-to the object glass. We should have then a small moist chamber in the soil. When illuminating it through the object glass we could observe through the cover slide the organisms, which develop inside. Such a transparent soil camera can be, of course, prepared also by artificial means.

This is in short the idea of the soil chamber, on which is based the method described in this article.

II.

In order to obtain preparations with soil chambers of definite standard size, sufficient for observing both slowly growing *bacteria* and rapidly propagating *fungi* the writer constructed a small apparatus — a *soil press* (fig. 1 and 2). When using this apparatus some slight constructive defects were discovered therein, which, however, can be easily remedied. They will be noted further.

The most essential part of this apparatus is a 3 mm thick cylindrical bar A, made as the rest of the apparatus of nickel plated copper. This bar is broadened at the base and forms here a cylindrical disc *B*, which has 4 mm in diameter and 1 mm in height. On the bar *A* can be moved a solid square plate *C* (18 mm × 18 mm) firmly adhering to it and which can be fixed immovably in any point of the bar *A* with the screw *D*. The bar *A* can also be moved in the vertical direction and may be fixed in any position by means of the screw *E*. Other parts of the apparatus are a stand, consisting of the table *F* (size 12 cm × 6 cm) with two clamps, the solid column *G* and the immovably fixed holder *H* with a muff, in which the bar *A* moves up and down. Those three parts (*F*, *G*, *H*) can, if necessary, be taken apart. The bar *A* can also be easily removed from the muff. For this purpose the column *G*, which is connected with the table *F* by means of a screwnut, must be turned at a certain angle. In such a way all the apparatus can be taken to pieces.

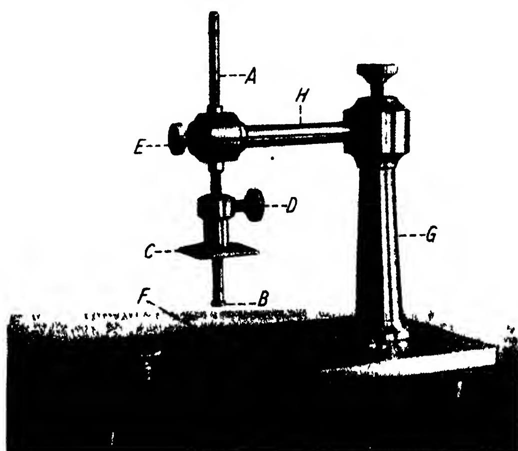


Fig. 1.

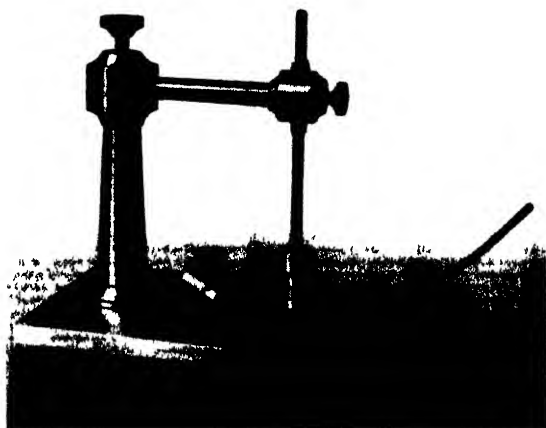


Fig. 2.

If we wish to make a preparation with a soil camera, we place an object glass on the table *F* so, that its centre is opposite to the bar *A*, and

fix it with the clamps. Then we lower the bar *A* and, firmly pressing it to the surface of the glass, fix it immovably with the screw *E*. The bar *A* must be orientated beforehand strictly normally to the table in order to leave no free space between the surfaces of the glass and of the disc *B* after pressing down the bar. Then we lower also the plate *C*, setting its edges parallel to the edges of the object slide, press it firmly to the disc *B* and fix it with the screw *D*.

When all these manipulations are accomplished, a free slitlike space about 1 mm in height remains between the bottom surface of the plate *C* and the upper surface of the object glass. The middle of this slit is occupied by the disc *B*. The free space must be now filled with soil.

For this purpose we place on the plate *C* the metal fork, depicted on fig. 3. The distance between its prongs is 18 mm, i. e. corresponds exactly to the breadth of the plate *C*. Each prong, as well as the connecting part, are 2,5 mm thick, so that the slit between the plate *C* and the object slide is now completely shut on three sides by metal walls. The fourth one remains open, and here soil is introduced (s. fig. 2).



Fig. 3.

The previously sifted soil must be moderately moist so that its particles cling easily together, without forming, however, semiliquid mud. To insert the soil it is best to use a thin spatula of whale bone or other similar material, slightly narrowed at one end. When pushing in the soil, it must be gradually slightly pressed. When a sufficient quantity is inserted and the soil shows marked resistance to the spatula, pushed in the slit, the fork is taken off and laid again so, that another side of the slit is open. A new quantity of soil is inserted and pressed in. The fork is once more removed and superposed in a new position, the same operation of inserting soil being performed on the third and fourth sides. Superfluous soil is removed from the object glass.

In this way all the space between the object slide and the plate *C*, except the middle part, occupied by the disc *B*, is filled with slightly pressed soil. Now we unscrew *D* and carefully lift the plate *C*. If the soil has formed a firm enough layer with a smooth upper surface, we unscrew *E* and lift the bar *A*. Instead of the disc *B* there now remains inside the soil layer a round hollow 4 mm in diameter. Not letting the soil get dry, we lay immediately on its surface a clean cover glass (18 mm × 18 mm), passed through the flame, press it slightly down, and the preparation is ready; such a one is depicted on fig. 4.



Fig. 4.

Ready preparations are kept at room temperature in a dark space, saturated with water-vapour.

When carefully operating, the apparatus described yields quite satisfactory results. If, however, working with the spatula, we press it in too hard, the bar *A* bends slightly, causing thereby a certain alteration in the shape and size of the soil chamber. To avoid this, it is advisable to press firmly the fork, when filling with soil the space under the plate *C*. This defect could be also avoided or, at least, considerably diminished, if we should reduce the distance between the horizontal holder *H* and the table *F* to 4 cm (instead of 6 cm in the model, used by the writer). Increasing the diameter of the bar would bring about the same results, but it is not desirable, for it would also increase the size of the soil chamber and lessen the quantity of the soil under investigation, which would hardly be conformable to the aim, if we use cover glasses 18 × 18 mm.

Of course, it would be also advantageous to employ instead of nickel plated copper some stronger material, such as non-rusting steel. This concerns however only the most important and working parts, viz. the bar *A* and the plate *C*.

III.

In this paper the writer intends to give only the short description of the method and of the first observations on the development of microorganisms in soil chambers. A more detailed description of these observations and experimental data, obtained by means of the new technic, shall be given later in another article.

In a just prepared soil chamber the microscope will, of course, show no microorganisms on the inner side of the cover glass. The first pioneers, that invade this free space in the soils, used for preparations (forest soils of the environs of Kiev), are *Fungi*. Their hyphae, penetrating from the soil into the chamber, grow there rapidly, adhering to the surface of the glass, and produce different fructifications. Thus the determination of these organisms presents mostly no difficulties.

After the fungi appear *Bacteria*, at first only in the peripheric parts of the camera, near the soil particles, that cover here the surface of the glass. The bacteria spread beyond the limits of soil conglomerates on the parts nearer to the centre of the cover slide in different ways. The most common is, to all appearance, the formation of a voluminous colloid mass, produced by the bacteria themselves. The secretion of a strongly swelling gel by the cells or, which is more likely, the sliming of the outer layers of their membranes is, evidently, a phenomenon quite common among the soil bacteria. As the quantity of the gel produced frequently exceeds many times the volume of the cells, the movement of these at marked distances takes place, as a result of the pressure of the secreted and swollen slime. So a slimy ring is soon formed on the periphery of the chamber, near the soil layer. This ring contains a great number of various bacteria and also unorganized particles, mechanically taken up by the colloid substance, when penetrating from the region of soil

conglomerates by the line of least resistance to the centre of the chamber.

In this peripheric zone soon come forward colonies of certain microorganisms that are able to propagate rapidly under existing conditions. The writer could easily find out many forms already known to him and observed before when studying the same soils by means of the buried slides.

Frequently also had been observed the spreading of bacteria beyond the peripheric slime zone towards the centre of the chamber. This is possible owing to the droplets of water, condensed on the surface of the glass. These droplets come sometimes in immediate contact with the swollen colloid substance of the slime zone, thus opening a way at first for the motile forms, which are observed in each preparation. Then the non-motile bacteria also gradually invade the droplets, brought here by streams of water, which are produced by capillar forces, changes of temperature, probably also by electric, osmotic and other phenomena.

The observations on the microorganisms of soil chambers also confirmed the conclusion the writer had drawn before when studying the soil slides: the fungal hyphae seem to play an eminent role in the spreading of bacteria in soil. Always surrounded with a more or less thick sheath of water, these hyphae, especially the dead ones, evidently secrete in the surrounding water various organic substances, which attract a great many bacteria and enable them to spread rapidly further.

Besides bacteria different other microorganisms invade the soil chamber: numerous *Amoebae*, hunting for bacteria, are often observed, sometimes also *Flagellates*. Rather early appear *Actinomycetes*. Some of them seem to move actively and crawl from one place to another. The formation of spores by these microorganisms is exceedingly well seen. Seldom can be found *Algae*, especially if the preparation was exposed some time to the light.

Of considerable interest are observations on soils to which different organic substances were added. Thus the addition of mannite to investigated forest soils caused a luxuriant growth of various fungi, which failed to appear under other conditions. If peptone was added, a sudden abundant development of large lively moving bacilli was observed, which temporarily took the upper hand on all other microorganisms. As it is known, *Winogradsky* has already stated before, that under the influence of sudden chemical changes the biological equilibrium in the soils is also disturbed and various alterations of the primordial (autochtonous) microflora are observed.

These first experiments show that the soil chambers can be used for studying the connection between the chemistry of the soil and its microflora.

There is hardly need to state, that the preparations with soil chambers can be kept under different conditions as to the temperature, light, moisture, chemical constituents of air etc. Thus the influence of all these factors upon the microflora can be studied. It is clear, that the technic proposed here enables us to make much wider and more manifold experiments than the method of buried slides.

As in the soil chambers many colonies and separate bacteria cells lie on the glass singly, more or less far from other ones, it will scarcely be difficult, when using the contemporary technic, to isolate them and inoculate in various sterilized nutritive media for further investigations. For this purpose it would be at first necessary to remove the cover glass from the soil layer and to fix it then over a moist chamber of the usual type, in which could be inserted microneedles or micropipettes of a micromanipulator. The employing of simpler methods (e. g. of an usual bacteriological needle with a "bacterial harpoon" etc.) is not excepted, especially for isolating fungal spores and larger microorganisms. This side of the new method however is not yet worked out by the writer.

In conclusion it must be stated, that the optical conditions for investigating microorganisms in soil chambers of the type proposed are quite good and allow to use not only dry systems but also the strongest immersion objectives. Removing immersion oil from the cover glass after the investigation presents no difficulties, for the cover slide mostly adheres pretty firmly to the smooth surface of the damp soil layer. Therefore careful wiping with a benzin soaked rug does not move the glass and causes no harm to the microorganisms that cover its inner surface.

If the investigator after studying the microbes of the soil chamber in a live condition wishes to observe them fixed and stained, the cover glass must be carefully removed and treated in the usual way.

The strong point of the new method described above is undoubtedly its considerable simplicity, which enables us to employ it (except the procedure of isolating pure cultures) even in primitively furnished laboratories of the field type

All said above allows, in the writer's opinion, to expect, that the method of soil chambers will be of use, when investigating the microorganisms of the soil, and will present a valuable supplement to the other methods generally accepted in soil microbiology.

Summary.

1. The study of the s. c. soil slides (*Cholodny* 1930) shows, that a considerable number of soil microorganisms can develop on the surface of the clean glass inside small hollows, which are formed in many parts

of the slide, because in some places the soil does not adhere closely to the glass.

2. From this observation arose the idea, that soil microorganisms can be studied in their natural habitat and in natural conditions, when cultivated in small transparent hollows, soil chambers.

3. To get preparations of soil with transparent chambers adapted for microscopic investigations, the writer constructed an apparatus, the soil press, described in this paper.

4 A ready preparation with a soil chamber presents an uniformly thick (about 1 mm) layer of the moist soil, placed between an object- and a cover-slide. In the middle part of this layer is a cylindric hollow (about 4 mm in diameter), which serves for microscopic study of the soil microorganisms.

5. Various soil microorganisms (*Bacteria*, *Fungi*, *actinomycetes*, *protozoa*) develop inside such chambers on the clean surface of the cover glass, partly in a narrow peripheric zone, immediately near the particles of soil, that form the walls of the chamber, partly on the portions of the glass, nearer to its centre.

6. By means of the method of soil chambers can be performed continuous observations on different soil microorganisms "in vivo", in natural conditions, and the influence of soil treatment on the microflora can also be studied experimentally. It may be possible to isolate some microorganisms and transfer them on sterilized nutritive media for further investigations.

7 The method proposed can present a valuable supplement to other methods generally employed in soil microbiology

Literature.

N. Cholodny, Arch. f. Mikrobiol. 1, 620, 1930. — *H. J. Conn*, N. Y. Agric. Exp Station, Technic. Bull. 64, 1918. — *H. J. Conn*, Centralbl. f. Bakt. II, 87, 233, 1932. — *K. J. Demeter*, Centralbl. f. Bakt. II, 88, 384, 1933. — *A. Rippel*, Der Biologe 1, 103, 1932. — *G. Rossi*, Annali del R. Ist. Sup. Agr. di Portici 5, 233, 1933. — *S. Winogradsky*, Ann. de l'Inst. Pasteur 42—50, 1925—1933.

(Aus dem Botanischen und Kältetechnischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Das Wachstum von Schimmelpilzen auf gekühltem Fleisch bei verschiedenen Luftzuständen[1].

Von

W. Schwartz und **G. Kaeß.**

Mit 10 Abbildungen im Text und auf Tafel I.

(Eingegangen am 12. Oktober 1933.)

I. Einleitung.

Luftanalysen in Schlachthausern, Kühl- und Gefrierräumen haben ergeben, daß neben Bakterien auch Konidien und Sporen von Pilzen vorhanden sind, die, ebenso wie die Bakterien, als Schädlinge auf dem Fleisch auftreten.

Da die Bakterien im allgemeinen auf stickstoffreichen Substraten am besten gedeihen, bietet ihnen das Fleisch gunstige Lebensbedingungen. Keime, die sofort nach der Schlachtung auf die Fleischoberfläche gelangen, treffen auf einen p_H-Wert, der oberhalb 7,1 liegt. Erst im Verlauf der autolytisch bedingten Reifeprozesse wird die Reaktion schwach sauer (*Rasmusson*, 1931). Auch unter diesen Bedingungen finden zahlreiche fleichzerstorende Bakterien noch hinreichende Entwicklungsmoglichkeiten (*Bidault*, 1923).

Bei Mischinfektionen hangt es in erster Linie von den Feuchtigkeitsverhältnissen an der Fleischoberfläche, in zweiter Linie auch vom gegenseitigen Verhältnis der Bakterien und Pilzkeime bei der Primarinfektion ab, ob *Bakterien* oder *Pilze* bei der Besiedelung und Zerstorung des Fleisches vorherrschen. Bakterien sind auf Substraten, an deren Oberfläche eine relative Luftfeuchtigkeit von weniger als 99 bis 100% herrscht, bereits gehemmt und stellen, von seltenen Ausnahmen abgesehen, bei 96% relativer Feuchtigkeit ihre Entwicklung ein. Wir treffen auf Schimmelpilzinfektionen also namentlich dann, wenn z. B. bei längerer Lagerung der osmotische Druck und der Quellungsdruck an der Fleischoberfläche über einen Betrag von 52 Atm. steigen (vgl. *Walter*, 1931).

Mit der Bestimmung der einzelnen auf Fleisch vorkommenden Arten hat sich *Bidault* (1923) beschäftigt. Er hat festgestellt, daß die Zusammensetzung der Flora in den Kühlhäusern und auch in den einzelnen Kühlräumen wechselt und besonders von den Lagerbedingungen abhängt. Der Häufigkeit nach geordnet, fanden sich auf Gefrierfleisch: *Chaetostylum Fresenii van Tieghem, Thamnidium elegans Link, Penicillium crustaceum Fries, P. glaucum Link, Cladosporium herbarum Link, Stysanus stemonitis Persoon* und *Botrytis spec. Micheli*. Die Oberfläche von aufgetautem Fleisch weist Arten auf wie *Mucor racemosus Fresenius, M. spinosus van Tieghem, M. mucedo Linné, M. pusillus Link*. Fast gleichzeitig haben

[1] Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch den wissenschaftlichen Beirat des V. D. I., wofür auch an dieser Stelle gedankt sei.

of the slide, because in some places the soil does not adhere closely to the glass.

2. From this observation arose the idea, that soil microorganisms can be studied in their natural habitat and in natural conditions, when cultivated in small transparent hollows, soil chambers.

3. To get preparations of soil with transparent chambers adapted for microscopic investigations, the writer constructed an apparatus, the soil press, described in this paper.

4. A ready preparation with a soil chamber presents an uniformly thick (about 1 mm) layer of the moist soil, placed between an object- and a cover-slide. In the middle part of this layer is a cylindric hollow (about 4 mm in diameter), which serves for microscopic study of the soil microorganisms.

5. Various soil microorganisms (*Bacteria*, *Fungi*, *actinomycetes*, *protozoa*) develop inside such chambers on the clean surface of the cover glass, partly in a narrow peripheric zone, immediately near the particles of soil, that form the walls of the chamber, partly on the portions of the glass, nearer to its centre.

6. By means of the method of soil chambers can be performed continuous observations on different soil microorganisms "in vivo", in natural conditions, and the influence of soil treatment on the microflora can also be studied experimentally. It may be possible to isolate some microorganisms and transfer them on sterilized nutritive media for further investigations.

7. The method proposed can present a valuable supplement to other methods generally employed in soil microbiology.

Literature.

N. Cholodny, Arch. f. Mikrobiol. **1**, 620, 1930. — *H. J. Conn*, N. Y. Agric. Exp. Station, Technic. Bull. **64**, 1918. — *H. J. Conn*, Centralbl. f. Bakt. II, **87**, 233, 1932. — *K. J. Demeter*, Centralbl. f. Bakt. II, **88**, 384, 1933. — *A. Rippel*, Der Biologe **1**, 103, 1932. — *G. Rossi*, Annali del R. Ist. Sup. Agr. di Portici **5**, 233, 1933. — *S. Winogradsky*, Ann. de l'Inst. Pasteur **42—50**, 1925—1933.

(Aus dem Botanischen und Kältetechnischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Das Wachstum von Schimmelpilzen auf gekühltem Fleisch bei verschiedenen Luftzuständen[1].

Von

W. Schwartz und **G. Kaeß.**

Mit 10 Abbildungen im Text und auf Tafel I.

(Eingegangen am 12. Oktober 1933.)

I. Einleitung.

Luftanalysen in Schlachthäusern, Kühl- und Gefrierräumen haben ergeben, daß neben Bakterien auch Konidien und Sporen von Pilzen vorhanden sind, die, ebenso wie die Bakterien, als Schädlinge auf dem Fleisch auftreten.

Da die Bakterien im allgemeinen auf stickstoffreichen Substraten am besten gedeihen, bietet ihnen das Fleisch günstige Lebensbedingungen. Keime, die sofort nach der Schlachtung auf die Fleischoberfläche gelangen, treffen auf einen p_H-Wert, der oberhalb 7,1 liegt. Erst im Verlauf der autolytisch bedingten Reifeprozesse wird die Reaktion schwach sauer (*Rasmusson*, 1931). Auch unter diesen Bedingungen finden zahlreiche fleichzerstörende Bakterien noch hinreichende Entwicklungsmöglichkeiten (*Bidault*, 1923).

Bei Mischinfektionen hangt es in erster Linie von den Feuchtigkeitsverhältnissen an der Fleischoberfläche, in zweiter Linie auch vom gegenseitigen Verhältnis der Bakterien und Pilzkeime bei der Primärinfektion ab, ob *Bakterien* oder *Pilze* bei der Besiedelung und Zerstörung des Fleisches vorherrschen. Bakterien sind auf Substraten, an deren Oberfläche eine relative Luftfeuchtigkeit von weniger als 99 bis 100% herrscht, bereits gehemmt und stellen, von seltenen Ausnahmen abgesehen, bei 96% relativer Feuchtigkeit ihre Entwicklung ein. Wir treffen auf Schimmelpilzinfektionen also namentlich dann, wenn z. B. bei längerer Lagerung der osmotische Druck und der Quellungsdruck an der Fleischoberfläche über einen Betrag von 52 Atm. steigen (vgl. *Walter*, 1931).

Mit der Bestimmung der einzelnen auf Fleisch vorkommenden Arten hat sich *Bidault* (1923) beschäftigt. Er hat festgestellt, daß die Zusammensetzung der Flora in den Kühlhäusern und auch in den einzelnen Kühlräumen wechselt und besonders von den Lagerbedingungen abhängt. Der Häufigkeit nach geordnet, fanden sich auf Gefrierfleisch: *Chaetostylum Fresenii van Tieghem, Thamnidium elegans Link, Penicillium crustaceum Fries, P. glaucum Link, Cladosporium herbarum Link, Stysanus stemonitis Persoon* und *Botrytis spec. Micheli*. Die Oberfläche von aufgetautem Fleisch weist Arten auf wie *Mucor racemosus Fresenius, M. spinosus van Tieghem, M. mucedo Linné, M. pusillus Link*. Fast gleichzeitig haben

[1] Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch den wissenschaftlichen Beirat des V. D. I., wofür auch an dieser Stelle gedankt sei.

ordentlich gleichmäßiger Verlauf der Temperatur; vor allem fehlt ein Abfall derselben durch nächtliche Abkühlung. Der Feuchtigkeitsgehalt ist infolge der großen Luftruhe verhältnismäßig hoch; nur durch die Föhnwirkung absteigender Luftströmungen kann eine stärkere Austrocknung eintreten. Auch im Boden sind die Temperaturschwankungen gering und erreichen nur bei Änderung des allgemeinen Witterungscharakters höhere Werte.

Die Vegetation besteht aus einer *Erica*heide mit *Ilex*, *Bergahorn* und *Krummholz*büschen. Um die Station findet sich lichter Mischwald aus *Fichte*, *Tanne* und *Rotföhre*. Vorherrschend sind *Pimpinella magna*, *Erica carnea* und *Scabiosa alpestris*; ferner wachsen hier die tropischen Familien angehörenden Moose *Hookeria* und *Brotherella*.

Die Station *Nos* ist außerordentlich arm an ständigen tierischen Bewohnern. Im Rohhumus *Oribatiden* und *Collembolen*.

V. Finstergstaud (1110 m) (*Fd*).

Schwacher Querriegel in steil abfallendem Tal; der Untergrund besteht aus Dolomit und Kalk. Durch die im SO und W überragenden Wände sowie durch Baumwuchs (*Fichten*bestand) beschattet; Exposition nur gegen NW. Daher Temperaturschwankungen sehr gering, vor allem im Boden. Infolge der windgeschützten Lage ändert sich auch der Feuchtigkeitsgehalt nur wenig.

Hochgrasige Wiese mit Hochstauden, wie *Senecio fuchsii* und viel *Trollius europaeus*; in der Umgebung *Fichten*wald.

VI. Gstettneralm (1270 m) (*Gm*).

In das Plateau eingesenkte Doline auf Dachsteinkalk, allseits von wesentlich überhöhenden Hängen umgeben, mit einem Grunddurchmesser von etwa 250 m; neben der Station ein Tümpel. Am Grunde der Doline bei schönem Wetter außerordentlich starke Temperaturschwankung mit Absinken bis zu einem nächtlichen Minimum. Die relative Feuchtigkeit macht die gegenläufigen Schwankungen durch, allerdings mit einer längeren Andauer voller Sättigung in der Nacht. Diese extremen Verhältnisse werden ganz wesentlich gefördert durch die windgeschützte Lage. Stärkere Temperaturschwankungen der Bodenoberfläche finden sich an den nicht durch Pflanzenwuchs geschützten Stellen, wenn auch wesentlich geringer als bei *Meisterau*.

Auf der sehr kurzrasigen Almweide ist unter anderem *Rumex alpinus* anzutreffen, an den Wänden der Doline *Krummholz*, erst weiter oben *Fichten*.

Zum ständigen Tierbestand gehören wenige Arten, die kälteresistent sind.

VII. Meisterau (1530 m) (*Mu*).

Schwach gegen S und SW geneigte Almwiese am höchsten Punkt eines Plateaus mit einzelnen Steinen und niedrigen Fichten; nördlich der Station ein Tümpel. Die vollkommen freie Lage bedingt geringe tägliche Schwankungen der Lufttemperatur und infolge der großen Windgeschwindigkeit stärkere Austrocknung des Bodens. Bei Änderungen des allgemeinen Witterungscharakters, z. B. bei Kälteeinbrüchen, folgt die Temperatur rasch. Auch tritt bei schlechtem Wetter, vor allem bei Nebel, vollständige Sättigung der Luft mit Wasserdampf ein; hingegen kann die relative

Walter (1931) hat das Verhalten einer Anzahl von Mikroorganismen gegenüber verschiedenen relativen Feuchtigkeiten im hängenden Tropfen (Würze oder Hefewassergelatine) über Schwefelsäure-Wasser-Gemischen untersucht und drei Gruppen von Organismen unterschieden: Gruppe I zeigt zwischen 95 und 100 % relativer Feuchtigkeit gleiche Wachstumsintensität und fällt von einer Feuchtigkeit von 95 % an bis zur Wachstumsgrenze bei 85 %. Hierher gehören die Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus*. Gleichen Charakter weisen die Vertreter der Gruppe II auf (*Rhizopus, Phycomyces, Hefen*), jedoch beginnt der Abfall wesentlich früher. Die meisten *Bakterien* sowie einige feuchtigkeitsliebende Pilze gehören zur Gruppe III, bei der die Abnahme der Wachstumsintensität unmittelbar unterhalb einer Feuchtigkeit von 100 % einsetzt.

Tomkins (1928, 1929) hat bei einer großen Anzahl von Pilzen (*Alternaria citri, Trichoderma lignorum, Colletotrichum gloeosporioides, Botrytis cinerea, Penicillium digitatum* usw.) außer der relativen Feuchtigkeit der Luft auch die Temperatur geändert. Seine Versuchsanordnung bestand darin, daß Konidien ohne Zufuhr von Nährstoffen bei verschiedenen Feuchtigkeiten und Temperaturen auf Glasplatten keimten oder Nähragar, auf Glasplatten eingetrocknet, mit Konidien beimpft und den verschiedenen Versuchsbedingungen ausgesetzt wurde. In anderen Versuchen war bei konstanter Luftfeuchtigkeit der Wassergehalt des Substrats abgestuft. Als Maßstab dienten die Keimzeit und die Wachstumsgeschwindigkeit, gemessen an der Länge der Keimschläuche oder am Durchmesser der Kolonien.

Bei den Versuchen auf vorher ausgetrocknetem Nähragar (*Dox'* Agar) erreichte, von einigen Ausnahmen abgesehen, die Wachstumsgeschwindigkeit bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit ihren höchsten Wert und nahm mit sinkender Feuchtigkeit ab.

Bei Versuchen mit abgestuftem Wassergehalt des Nähragars nahm die Wachstumsgeschwindigkeit z. B. bis zu einem Wassergehalt von etwa 33 % in „gesättigter" Atmosphäre und 40 % in trockener Atmosphäre[1] zu, um dann bei höheren Wassergehalten des Substrats allmählich wieder zu sinken, und zwar über „wasserdampfgesättigter" Luft stärker als über „trockener". (Versuch mit *Colletotrichum* bei 25° C, 1928). Verglichen mit den Versuchen auf vorgetrocknetem Agar und mit den Ergebnissen *Walters*, scheint hier ein Widerspruch zu bestehen, der noch der Klärung bedarf.

II. Fragestellung und Methoden.

Wir haben uns die Aufgabe gestellt, unter Verwendung von Reinkulturen das Wachstum einiger auf Fleisch besonders häufiger Schimmelpilze bei Temperaturen oberhalb 0° in dem für die Kühltechnik wichtigen Feuchtigkeitsbereich bei ruhender Luft zu untersuchen.

Herkunft und Artbestimmung der untersuchten Pilze.

Luftanalysen in den städtischen Schlachthäusern von Karlsruhe und Mannheim und die Untersuchung von angeschimmelten Fleischstücken dienten zur Orientierung über die Zusammensetzung der

[1] Luft über Calciumchlorid getrocknet.

Schimmelpilzflora in Kühlhäusern. Von den Rohkulturen wurden nach dem *Koch*schen Verdünnungsverfahren Reinkulturen hergestellt. Unter etwa 20 isolierten Stämmen herrschten die Gattungen *Mucor* und *Penicillium* vor, während eine *Aspergillus*-Art nur in einem Fall auftrat. Vereinzelt fanden sich rosa Hefen. Ein *Mucor* und ein *Penicillium* waren besonders häufig und wurden aus diesem Grunde für die Untersuchung ausgewählt; ferner ein Schwärzepilz, dessen Vorkommen auch in der Literatur (*Brooks* und *Kidd* 1921, *Berger* 1912) des öfteren erwähnt wird, und schließlich ein von Dörrfleisch isolierter Vertreter der Gattung *Acaulium*.

Die genaue Artbestimmung ergab: für das *Penicillium*: *P. flavo-glaucum Biourge Nr. 73** (*Biourge*, 1923, *Thom*, 1930); für den *Mucor*: eine niedrige Form des *M. racemosus Fresenius* (*Rabenhorst*, 1892); für den Schwärzepilz: *Cladosporium herbarum Link* (*Rabenhorst*, 1907); und für das *Acaulium*: *Penicillium* (*Scopulariopsis*) *rufulus Bainier* (*Thom*, 1930).

Temperatur und Feuchtigkeitsintervalle.

Mit diesen Arten wurden Fleischstücke geimpft und Temperaturen von 0, 3 und 6° C ausgesetzt. 0° C wurde gewählt, weil dies die Temperatur ist, deren Einhaltung in den Kühlräumen der Schlachthöfe angestrebt werden soll. In Kleinkühlräumen werden durchschnittlich 3° eingehalten, und in Haushaltskühlschränken begnügt man sich mit Temperaturen von etwa 6°. Den Einfluß der Luftfeuchtigkeit prüften wir in Stufen von je 5% zwischen 75 und 100%.

Kühlschrank und Versuchsgefäße.

Für die Ausführung der Versuche stand ein Haushaltskühlschrank der Firma *A. Teves*, Frankfurt a. M., zur Verfügung. Die eingebaute Vorrichtung für die Temperaturregelung wurde durch einen Thermokontakt ersetzt, dessen Quecksilberbehälter zur Verbesserung des Wärmeüberganges die Form einer spiralig gewundenen Glasröhre hatte. Temperaturmessungen im Schrank ergaben bei ruhender Luft Unterschiede bis zu 5° zwischen der Temperatur am Boden und an der Decke. Durch Einbau einer Zwischenwand ließ sich der Luftumlauf so verbessern, daß sich dieser Wert auf die Hälfte verminderte. Erst durch die Verwendung eines Ventilators, der während der Versuche ununterbrochen lief, gelang es, die zeitlichen und örtlichen Temperaturschwankungen auf $\pm\,{}^1/_{10}{}^0$ C zu verringern, was für den Verwendungszweck hinreichend genau erschien. Bei starker Luftumwälzung hat die Anwendung eines gewöhnlichen Kontaktthermometers mit $^1/_{10}$ Gradteilung keine Nachteile mehr gegenüber dem oben erwähnten Thermometer mit vergrößerter Quecksilberoberfläche.

Die Kälteerzeugung erfolgte durch ein Kompressoraggregat. Die Betriebsweise der automatischen Einrichtung geht aus Abb. 1 hervor. Für die Schaltung dienten zwei Stromkreise (Wechselstrom): Im Stromkreis I liegen die Maschine und die Schaltröhre des Cutaxrelais *R*. Die Magnetspule *M* des Relais ist im Kreis II angeschlossen und wird durch das Kontakt-

* Herrn Prof. Dr. *Ph. Biourge* danken wir bestens für die freundliche Unterstützung bei der Artbestimmung des *Penicillium*.

thermometer K gesteuert. Das Thermometer verträgt nur eine Spannung von 3 bis 5 Volt. Die Herabsetzung der Spannung geschieht durch den Klingeltransformator Tr. Wird im Schrank die eingestellte Temperatur überschritten, so schließt Stromkreis II, und gleichzeitig wird in der Schaltröhre eine leitende Verbindung hergestellt. Damit beginnt der Kühlvorgang, der mit der Wiederherstellung der gewählten Schranktemperatur endet. Die Schalteinrichtung und die Kühlanlage arbeiteten während der ganzen Versuchszeit einwandfrei.

Für die Lagerung der Fleischproben wurden würfelförmige Glasgefäße von 100 mm Kantenlänge benutzt (vgl. *Schwartz* und *Schmid*, 1931), die in etwa 35 mm hoher Schicht Kochsalzlösungen verschiedener Dichte enthielten. Die Fleischstücke hingen in den luftdicht verschlossenen Gefäßen an Drahtgestellen über der Salzlösung.

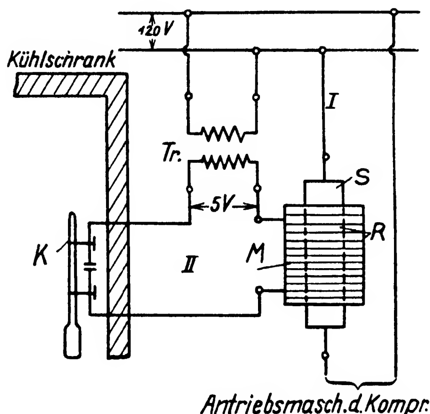


Abb. 1.
Schaltungsschema für die automatische Temperaturregulierung im Kühlschrank.

Vorbereitung der Fleischstücke für den Versuch.

Die Vorbereitung der Fleischstücke erforderte weitgehende Vorsichtsmaßregeln, da Bakterieninfektionen nach Möglichkeit verhütet werden sollten. Als Arbeitsraum diente eine Impfkabine, die sich durch Zerstäubung von Formaldehyd 24 Stunden vor der Benutzung entkeimen ließ. Die Ausführung sämtlicher Manipulationen an den Fleischstücken geschah außerdem im Impfkasten unter Verwendung von Gummihandschuhen und sterilen Instrumenten. Das zur Verwendung gelangende fett- und hautfreie Fleisch stammte stets vom gleichen Muskel von Tieren, die 2 bis 3 Stunden vorher geschlachtet worden waren. Ein Übergießen mit Alkohol und Abflammen ermöglichte es, Keime auf der Oberfläche abzutöten.

Größe und Gestalt der Fleischstücke ergaben sich aus folgenden Erwägungen: Die Modellstücke sollten so beschaffen sein, daß sie den Verhältnissen in der Praxis möglichst nahe kommen. Als Anhaltspunkt diente eine Angabe von *Hirsch* (1927), der für Rinderviertel das Verhältnis von Oberfläche zu Gewicht mit 0,02 qm kg bestimmt hat. Für zylindrische Fleischstücke von gleicher Höhe und gleichem Durchmesser hätten sich daraus Maße von 30 cm ergeben. Die Ausführung von Untersuchungen an derartigen Stücken hatte jedoch eine große Apparatur zur Voraussetzung gehabt, deren Aufstellung und Unterhaltung zu kostspielig gewesen wäre. Wir gingen daher von der Größe der Glasgefäße aus, die bei unserer Versuchsanordnung 350 ccm Salzlösung aufnehmen konnten. Da die Sole allmählich auf dem Wege über die Luft dem Fleisch Wasser entzieht, war der Größe der Fleischstücke eine Grenze gesetzt. Bei den höchsten Solekonzentrationen, die einer relativen Feuchtigkeit von 75 % entsprachen, waren Gewichtsverluste bis zu 60 % zu erwarten. Die Wasseraufnahme führt zu einer Zunahme der Dampfspannung an der Oberfläche der Lösung.

Die Genauigkeit der Versuche erfordert, daß die Erhöhung der relativen Feuchtigkeit 1% nicht überschreitet (vgl. *Schwartz* und *Schmid*, 1931).

Trägt man die Werte der relativen Feuchtigkeit über dem spezifischen Gewicht der Kochsalzlösung auf, wie sie *Linge* (1929) angibt, und ergänzt die Kurve durch das Wertepaar im Zustande der Sättigung der Lösung aus den Tabellen von *Landolt-Börnstein*, so ergibt sich für die konzentrierte Sole ($\gamma_a = 1{,}203$) die relative Feuchtigkeit $\varphi_a = 75{,}25\%$. Für die zugelassene Erhöhung der Feuchtigkeit um 1% kann man aus der Kurve das spezifische Gewicht zu $\gamma_e = 1{,}199$ ablesen. Ist G das Gewicht und V das Volumen der Natriumchloridlösung, so vermehren sich infolge Wasseraufnahme bis Versuchsende das Gewicht um den Betrag Δg und das Volumen um Δv. Da beide Größen zahlenmäßig gleich sind, ist $\Delta g = \Delta v = \Delta$, wenn g in Gramm und v in Kubikzentimeter gemessen werden. Im Höchstfall beträgt $\Delta = 0{,}6\, G_F$, wenn G_F das Gewicht des Fleisches ist. Für das Ende der Lagerzeit gilt somit

$$\gamma_e = \frac{G + 0{,}6\, G_F}{V + 0{,}6\, G_F}.$$

Man erhält

$$G_F = \frac{V(\gamma_a - \gamma_e)}{0{,}6\,(\gamma_e - 1)} \qquad \frac{350\,(1{,}203 - 1{,}199)}{0{,}6\,(1{,}199 - 1)} = 11{,}7\text{ g}.$$

Das Gewicht der gelagerten Fleischstücke darf also in jedem Versuchsgefäß höchstens 11,7 g betragen, wenn die angeführten Bedingungen eingehalten werden sollen. Es wurden schließlich zwei Fleischzylinder von je etwa 5 g Gewicht, einem Durchmesser von 30 mm und einer Höhe von etwa 7 mm verwendet, die im Versuchsgefäß einen Abstand von 5 cm hatten. Um für die Verdunstung in allen Fällen gleiche Voraussetzungen zu haben, erhielten die Fleischstücke stets möglichst dieselbe Oberfläche, was sich dadurch erreichen ließ, daß sie aus dem Innern der abgeflammten großen Stücke mit einem Schneidezylinder von 30 mm Durchmesser ausgestanzt wurden. Der Quotient aus Oberfläche und Gewicht ist bei diesen Versuchsstücken allerdings ungünstiger als in der Praxis ($O/G \sim 0{,}4$ qm/kg), so daß sich die Konzentration des Fleischsaftes an der Oberfläche in derselben Zeit und bei sonst gleichen Bedingungen etwas rascher ändert. Einzelne Abschnitte des Wachstums der Schimmelpilze dürften jedoch von den Verhältnissen bei der Lagerung im großen nur eine Verschiedenheit aufweisen, die sich durch Multiplizieren der gefundenen Ergebnisse mit einem konstanten Faktor beheben läßt. Werden Fleischzylinder verwendet, bei denen der Durchmesser gleich der Höhe ist, so läßt sich der Faktor durch Extrapolieren an Hand von Versuchen finden, bei denen nur der Durchmesser der Zylinder variiert wird.

Die Lagerung unter diesen Bedingungen stellt einen Fall dar, wie er in Kühlräumen in den „toten Räumen" besonders bei dichter Stapelung auftritt. Selbst in Kühlräumen ohne künstliche Luftbewegung ist durch den meist beträchtlichen Temperaturunterschied zwischen Kühlelement und Kühlluft immer noch eine freie Konvektionsströmung vorhanden. Durch die Luftbewegung werden die Wassermoleküle rascher abtransportiert, wodurch die Änderung des Oberflächenzustandes des Fleisches beschleunigt wird. Im Versuchsschrank betragen die Temperaturschwankungen weniger als $\pm\, {}^1/_{10}{}^0$ C. In den Lagergefäßen sind sie noch geringer. Konvektionsströme treten also nur in verschwindendem Maße auf. Der Wasseraustausch zwischen Fleisch- und Sole-Oberfläche erfolgt vorwiegend durch Diffusion.

Es wird ein Diffusionsgefälle zwischen dem Solespiegel und der Fleischoberfläche bestehen und von hier nach dem Innern der Fleischproben. Die Luftfeuchtigkeit ist also keineswegs gleichmäßig im Gefäß verteilt, was ja auch in der Praxis bei Lagerung in wenig bewegter Luft nicht der Fall ist.

Wollte man den Ausgleich der Feuchtigkeiten zwischen Fleisch und Salzlösung nach Möglichkeit beschleunigen, so bliebe nur übrig, mit dünnen Fleischschnitten (Mikrotomschnitten) in feuchten Kammern zu arbeiten.

Wir haben von der Ausführung dieser Versuche abgesehen, da von ihnen keine auf die Verhältnisse in der Praxis übertragbaren Ergebnisse zu erwarten sind. Es ist noch unbekannt, wie groß die relative Feuchtigkeit unmittelbar an der Oberfläche des in Kühlräumen gelagerten Gutes eigentlich ist, und in welchem Maße sie sich allmählich ändert.

Infektion der Fleischstücke.

Die natürliche Infektion erfolgt meist durch einzelne Sporen oder Konidien, die aus der Luft auf die Fleischoberfläche gelangen, dort auskeimen und ein Mycel bilden. Der Versuch, solche punktförmigen Infektionen nachzuahmen, scheiterte daran, daß die Konidien oder Sporen an den hangenden Versuchsstücken, besonders bei Lagerung in sehr feuchter Luft, mit dem Fleischsaft ablaufen. Ein Vergleich des Wachstumsverlaufes bei den einzelnen Messungen würde dadurch unmöglich werden.

Bei den Vorversuchen stellte sich schließlich eine Impfung in Form eines vertikal verlaufenden Striches (Abb. 2) als geeignet heraus.

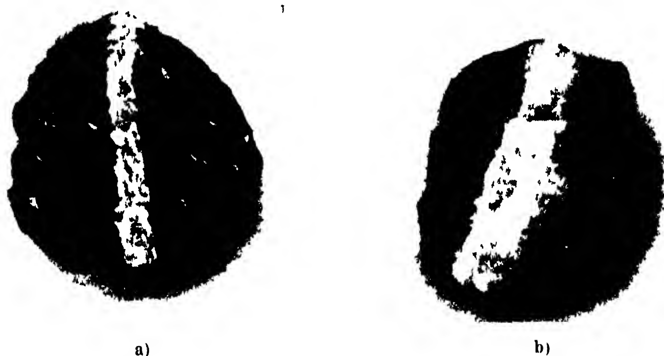


Abb. 2.

Versuchsstücke mit Impfstreifen von *Penicillium flavo-glaucum* ($t = 6^0$ C, $\varphi = 90\,^0/_0$).
a) 6 Tage nach der Impfung (Sichtbarwerden des Impfstreifens).
b) 10 Tage nach der Impfung.

Die Impfung erfolgte mit einem sterilen, schräg abgebogenen Glasstab von 3 mm Durchmesser. Das abgebogene Stück war 30 mm lang. Als Impfmaterial dienten 8 Tage alte Konidien oder Sporen von Reinkulturen in *Petri*-Schalen. Der schräg gebogene Teil des Glasstabes wurde zuerst auf den Pilzrasen, dann auf die Fleischflache aufgelegt. Um den Schimmelpilzen von Anfang an günstigere Entwicklungsmöglichkeiten als den Baktorien zu geben, wurde auf der Oberfläche des Fleisches vor der Impfung ein Tropfen 2 %iger steriler Citronensäurelösung verteilt[1]. Wie vergleichende

[1] Frischfleisch reagiert während der Totenstarre alkalisch.

Untersuchungen zeigten, hatte die Vorbehandlung mit Citronensäure keine unmittelbare Wirkung auf die Entwicklung der Schimmelpilze. Bei den brauchbaren Versuchen gelangten bei höheren relativen Feuchtigkeiten auf der gesamten Fläche des Versuchsstückes etwa zehn Bakterienkeime zur Koloniebildung, bei geringeren Feuchtigkeiten weniger oder bisweilen keine.

Messung des Pilzwachstums.

Während bei Untersuchungen über das Wachstum der Bakterien die Zahl der Bakterienzellen auf der Fleischoberfläche als Maß für die Ausbreitung der Bakterien und für die Schädigung des Fleisches dienen kann (*Schwartz* und *Schmid* 1931), sind beim Wachstum der Schimmelpilze die Verhältnisse weniger einfach, da flächenförmige Ausbreitung und Bildung der Fortpflanzungszellen unterschieden werden müssen. Da sowohl Flächenwachstum wie Konidien- oder Sporenbildung für die Haltbarkeit des Fleisches von Bedeutung sind, müssen beide Vorgänge untersucht werden.

a) Flächenwachstum.

Für die Flächenmessung wurde ein gewöhnliches Polarplanimeter[1] benutzt. Da Flächeninhalte von ungefähr 1 qcm an zu bestimmen waren, mußte der kürzeste Hebelarm eingestellt werden, um an der Zählrolle die am besten ablesbaren Werte zu erhalten. Die Pilzfläche wurde durchlaufend immer viermal umfahren, wobei unmittelbar Quadratzentimeter abgelesen werden konnten und die Meßfehler klein blieben. Aus zwei solchen Messungen wurde das Mittel gebildet. Meßinstrument und Pilzrasen lagen bei der Messung in einer Ebene. Obgleich die Begrenzung des Mycels nicht scharf ist, kann die Genauigkeit der Messung nach einiger Übung und unter Zuhilfenahme einer Lupe auf $\pm$ 4 Einheiten der zweiten Stelle nach dem Komma ($\pm$ 0,04 qcm) gebracht werden, was mit Hilfe einer größeren Reihe von Flächenbestimmungen festgestellt wurde.

Die Mittelwerte für die Auswertung der Flächenmessungen erhielten wir aus vier bis sechs Parallelproben. Um den Vergleich der Flächenwerte aus verschiedenen Versuchsstücken zu ermöglichen, sind übereinstimmende Anfangsbedingungen notwendig. Die vorhandenen verhältnismäßig kleinen Abweichungen ließen sich durch Umrechnung auf eine konstante anfängliche Impffläche dadurch ausgleichen, daß sämtliche Werte durch den Flächeninhalt des Impfstreifens dividiert wurden.

An den Stichtagen werden für jede Temperatur und Luftfeuchtigkeit an n Versuchsstücken die mit Mycel bedeckten Flächen F_1, F_2, ..., F_n festgestellt, aus denen man den Mittelwert $F_m = \frac{\Sigma F_n}{n}$ (qcm) erhält. Ist F_i in Quadratzentimeter die Fläche des Impfstreifens, so ergeben sich dann die reduzierten Flächenwerte zu $f_{\text{red.}} = F_m/F_i$, die das Flächenwachstum in Quadratzentimeter je Quadratzentimeter Impffläche bedeuten. Bei graphischer Darstellung der Flächenwerte mit der Zeit als Abszisse beginnen dann die Kurven mit dem Betrag 1. Nach den Maßen

[1] Die Firma *A. Ott* in Kempten hat uns liebenswürdigerweise das Instrument zu einem Vorzugspreise überlassen.

der Fleischstücke und des Glasstabes kann die Länge des Impfstriches auf ungefähr 30 mm, die Breite auf rund 3 mm geschätzt werden, was ohnehin einer Fläche von annähernd 1 qcm entspricht. Die gemessenen Flächen vergrößern oder verkleinern sich also bei der Umrechnung nur sehr wenig.

Diese Methode setzt allerdings voraus, daß man den Flächeninhalt des Impfstreifens genau kennt. Solange der Schimmelpilz noch kein sichtbares Mycel entwickelt hat, ist die Feststellung der geimpften Fläche nicht möglich. Hat ein meßbares Wachstum stattgefunden, so ist die gemessene Fläche bereits um einen geringen Betrag größer als die ursprünglich geimpfte Fläche. Es blieb also nur übrig, durch Extrapolation einen Wert zu ermitteln, der in allen Reihen dem des Impfstreifens möglichst nahe kam. Trägt man die erhaltenen Flächenmittelwerte über der Lagerzeit als Abszisse auf, so ergibt sich dieser Anfangswert mit hinreichender Genauigkeit graphisch durch Extrapolieren auf den Zeitpunkt, an dem bei Verwendung einer starken binokularen Vergrößerung (starkes Objektivpaar, Okular-

Tabelle I.

Beispiel für die Auswertung der Flächenmessungen.

F = gemessene Einzelfläche.
F_m — Mittelwerte der gemessenen Flachen.
Δ Streuung der gemessenen Flächengrößen um den Mittelwert.
$f_{red.}$ — reduzierte Flächen.
F_i = Impffläche.

Die Zahlen im ersten Abschnitt der Spalte F_m sind die nachträglich durch Extrapolieren erhaltenen Werte für F_i.

[*Penicillium flavo glaucum.* $t = 0^\circ$ C.]

Relative Feuchtigkeit φ %	F_m qcm	$\Delta = \pm \frac{\Sigma (F-F_m)}{n \cdot F_m}$	$f_{red.} = \frac{F_m}{F_i}$	Versuchsdauer Tage
100	1,16	—	1,00	
95	1,21	—	1,00	
90	1,12 } F_m F_i	—	1,00	8
85	1,16	—	1,00	
80	1,00	—	1,00	
100	1,17	—	1,01	
95	1,25	—	1,03	
90	1,13	—	1,01	10
85	1,17	—	1,01	
80	1,02	—	1,02	
100	1,66	0,13	1,43	
95	1,82	0,10	1,51	
90	1,48	0,09	1,32	15
85	1,18	0,08	1,02	
80	1,04	0,08	1,04	
100	2,89	0,09	2,49	
95	3,23	0,11	2,67	
90	2,31	0,08	2,06	22
85	1,78	0,09	1,54	
80	1,21	0,12	1,21	

Der Versuch wurde in dieser Weise bis zum 37. Tage fortgesetzt.

paar 2, binokulares Präpariermikroskop der Firma *Seibert*) das Pilzwachstum gerade festgestellt werden kann. Als Beispiel für die Auswertung der Versuche mag Tabelle I dienen.

Die Umrechnung auf die reduzierte Fläche darf natürlich nicht verallgemeinert und bei beliebigen Flächen benutzt werden. Für die hier angewandte Art der Berechnung ist immer eine Anfangsfläche von Gestalt des vorliegenden Impfstreifens die Voraussetzung. Will man aus den Messungen die Ausbreitung eines Schimmelpilzes von einer Infektionsstelle mit beliebiger Gestalt ermitteln, so muß man die Umfänge in Beziehung setzen, da es bei dem Flächenwachstum darauf ankommt, daß von der vorhandenen Sporen- oder Konidienzahl möglichst viele nahe am Umfang liegen und dort eine freie Fläche zur Entwicklung antreffen. Dies gilt auch nur mit der Einschränkung, daß eine gewisse Mindestzahl von Fortpflanzungszellen vorhanden ist, denn sobald die Keime nur vereinzelt auf der Impffläche liegen, findet jeder von ihnen günstigere Entwicklungsverhältnisse. Es ergibt sich auch, daß die Breite des Impfstriches sich nur wenig ändern darf, wenn man durch Division mit der Impffläche umrechnet. Im Falle eines sehr schmalen Streifens würde man im Vergleich mit dem wirklichen Wachstum zu hohe reduzierte Flächen erhalten. Die Bedingung einer möglichst konstanten Breite des Impfstriches kann bei unseren Versuchen als hinreichend erfüllt angenommen werden, da infolge der Verwendung desselben Impfstabes nur geringfügige Abweichungen möglich sind.

Gegen Ende des Versuchs kam es bisweilen vor, daß bei hohen Luftfeuchtigkeiten auch die Mantelfläche der Fleischzylinder teilweise überwachsen war. Die geringen Ausmaße dieser Pilzflächen erlaubten es, sie mit Hilfe des Stechzirkels unter Annahme einfacher geometrischer Figuren zu bestimmen und zu berücksichtigen. Bei *Mucor racemosus* wurde auch die zweite kreisförmige Fläche des Fleischstückes befallen, so daß auch diese planimetriert werden mußte. Um das Pilzmycel nicht zu schädigen, wurde dabei als Auflage für die zuerst gemessene Vorderseite ein Glasring benutzt.

Die von dem Schimmelpilz bedeckten gemessenen Flächen weisen eine Streuung um den Mittelwert von durchschnittlich $\pm$ 10% auf. Es liegt nahe, die Ergebnisse mit Hilfe der Korrelationsrechnung zu prüfen. Da aber nur wenige Punkte vorhanden sind, ist von dieser Rechnung keine genügende Genauigkeit zu erwarten. Die Streuung wird von dem Fehler überlagert, der durch das Meßinstrument bedingt ist, und etwa $\pm$ 0,04 qcm beträgt. Bei kleinen Flächenwerten von ungefähr 1 qcm wird die Angabe der Streuung dadurch um $\pm$ 4% beeinflußt. Bei Flächen, die größer sind als 4 qcm, wird der Fehler kleiner als 1% und kann dann neben der Streuung von $\pm$ 10% vernachlässigt werden.

Die Lagerung von Fleischstücken in Luft mit Dampfspannungen, die geringer sind als die an der Oberfläche der Proben, führt zu Gewichtsverlusten, solange ein Ausgleich der Dampfdrucke nicht erfolgt ist. Diese bedingen gleichzeitig eine Schrumpfung der Oberfläche der Fleischproben, wodurch auch die gemessene Pilzfläche in Mitleidenschaft gezogen wird. Über mit Wasserdampf gesättigter Luft fehlen derartige Verluste, da der Fleischsaft eine Dampfspannung besitzt, die kleiner als die des Wassers ist. Erst bei relativen Feuchtigkeiten von 90 bis 85% treten wahrnehmbare Flächenänderungen auf. Bei der Anwendung noch geringerer Feuchtigkeiten ist das Wachstum schon so stark gehemmt, daß nach kurzer Zeit kaum noch eine Flächenzunahme nachweisbar ist. Die absoluten Flächen-

beträge bleiben klein, so daß auch eine größere Schrumpfung nur eine unwesentliche Veränderung der reduzierten Werte bedingt. Eine Berücksichtigung der Flächenverkleinerung ist also nicht erforderlich. Auf die Bestimmung der Fehlbeträge haben wir verzichtet, so daß die Flächenwerte, die bei einem Wachstum bei Feuchtigkeiten unterhalb 95% bestimmt wurden, um einen kleinen Betrag zu niedrig sind.

b) Zählung der Konidien und Sporen.

Neben der direkten Schädigung des Fleisches durch das Mycelwachstum hat auch die Bildung von Fortpflanzungszellen (Konidien oder Sporen) praktische Bedeutung. Die Abhängigkeit ihrer Entstehung von Temperatur und relativer Feuchtigkeit mußte daher geprüft werden. Die Zahl der vom Mycel erzeugten Sporen oder Konidien kann mit Hilfe von Verdünnungskulturen durch Auszählung der Kolonien ermittelt werden. Die Größe der Zellen gestattet auch eine direkte Zählung unter Verwendung einer Zählkammer. Die Methode hat den Vorteil eines geringeren Zeitaufwandes, so daß eine größere Zahl von Bestimmungen ausgeführt werden kann. Der Nachteil, daß bei der Zählung lebende und tote Zellen nicht unterschieden werden, hat hier keine Bedeutung, da auf Frischfleisch bei niederen Temperaturen und verhältnismäßig kurzer Versuchsdauer die überwiegende Mehrzahl der Konidien und Sporen lebt, der entstehende Fehler also so gering sein dürfte, daß er vernachlässigt werden kann.

Für die Durchführung der Zählung müssen die Konidien und Sporen möglichst quantitativ vom Fleisch abgelöst und in Wasser aufgeschwemmt werden. Die Fleischstücke kommen in Glasgefäße und werden nacheinander mit 2 ccm Methylalkohol und 30 ccm Wasser versetzt. Der Methylalkohol tötet die Zellen ab und beschleunigt die Loslösung der Konidien vom Träger und ihre gleichmäßige Verteilung im Wasser. Die Gefäße standen während 1 Stunde im Vakuum einer Wasserstrahlpumpe. Nach dieser Behandlung wurden die Versuchsstücke herausgenommen und mit einem feinen Wasserstrahl abgespritzt, bis sich im mikroskopischen Präparat nur noch vereinzelte Fortpflanzungszellen auf dem Fleischstück nachweisen ließen. In einer Schüttelflasche, mit einer Teilung in Quadratzentimeter, wurde der Sporen- oder Konidiengehalt der Aufschwemmung durch 2 Minuten dauerndes Schütteln gut verteilt. Nach Feststellung der Flüssigkeitsmenge gibt man für jede Zählung einen Tropfen der Aufschwemmung in die Zählkammer[1].

Die auf diese Weise ermittelten Sporen- und Konidienzahlen bleiben hinter dem wirklichen Wert etwas zurück, da ein Teil der Zellen doch mit den Fleischstücken entfernt und daher nicht erfaßt wird. Insbesondere werden an den Konidienträgern die zuletzt entstandenen noch unreifen Konidien schlechter abgelöst.

Die ersten Zählungen erfolgten mit der beginnenden Reife der Fortpflanzungszellen, die meist an einer charakteristischen Verfärbung des Mycels zu erkennen ist. Es standen immer nur zwei bis drei Fleischstücke bei jeder relativen Feuchtigkeit zur Verfügung, aus deren Verarbeitung man natürlich keine exakten Mittelwerte erwarten kann. Die Feststellung der Konidien- oder Sporenzahl eines Versuchsstückes erfolgte durch viermaliges Beschicken der Kammer. Von der Zählfläche gelangten dann zehn verschiedene Reihen zur Auszählung. Damit ist eine gute Mittelbildung möglich als

[1] Zählkammer nach *Thoma* der Firma *Zeiss* in Jena. Anleitung zur Benutzung der Kammer bei *Janke-Zikes* (1928).

Unterlage für die Berechnung des Kammerinhaltes und der Anzahl Zellen auf einer Fleischprobe. Die gefundenen einzelnen Werte streuen um einen Mittelwert und ordnen sich nach der *Gauß*schen Fehlerkurve. Bei guter Verteilung und einem Reiheninhalt von 20 oder mehr Zellen ergab sich ein mittlerer Fehler von $\pm$ 15%, der sich bei kleineren Keimzahlen je Reihe vergrößert. Der mittlere Fehler ist $\mu = \sqrt{\frac{\Delta z^2}{n-1}}$, wenn Δz die Differenz der Anzahl Zellen in einer Reihe gegen die mittlere Anzahl und n die Zahl der ausgewerteten Reihen ist. Der Ablesefehler bei der Flüssigkeitsmessung ist $\pm$ 0,25 ccm, also bei 30 ccm Flüssigkeit weniger als $\pm$ 1%.

Die Einzelwerte der Zahlen für das gesamte Fleischstück weisen Abweichungen von durchschnittlich $\pm$ 25% gegen das Mittel auf. Bei einer derartigen Streuung haben wir von einer Korrektur durch Reduktion auf eine gleiche Impffläche abgesehen.

Versuche mit feuchten Kammern.

Da in den großen Versuchsgefäßen der Ausgleich der Feuchtigkeit allmählich erfolgt, sollten mit einer Methode, die einen besseren Ausgleich zwischen Wassergehalt des Substrates und der umgebenden Luft erlaubt, wenigstens die Grenzen für Keimung und Wachstum bei den einzelnen Schimmelpilzen bestimmt werden.

Diesem Zwecke dienten Versuche in feuchten Kammern, die einen Durchmesser von 30 mm und eine Höhe von 12 mm hatten. Jede Kammer enthielt zur Einstellung einer bestimmten relativen Feuchtigkeit 2 ccm Kochsalzlösung[1] oder destilliertes Wasser. Als Nährlösung diente Preßsaft, der aus frischem Fleisch unter möglichst sterilen Bedingungen gewonnen, dann durch ein steriles Faltenfilter filtriert, steril aufgefangen und schließlich mit Konidien oder Sporen geimpft wurde. Die Impfmenge bestand in jeder feuchten Kammer aus drei kleinen mit der Feder aufgetragenen Fleischsafttropfen. In diesen geringen Flüssigkeitsmengen stellt sich im allgemeinen weitgehend das Gleichgewicht mit der Luftfeuchtigkeit ein. Geprüft wurde der Bereich von 100% relativer Feuchtigkeit bis zur Grenzfeuchtigkeit von 85% in Stufen von 5% bei den höheren Feuchtigkeitsgehalten und 2% in der Nähe der Grenzfeuchtigkeit. Die Versuchstemperatur betrug + 10 und + 3° C.

III. Versuchsergebnisse.

1. Verlauf des Wachstums.

Trägt man bei den verschiedenen Temperaturen die reduzierten Flächen über der Lagerzeit mit der relativen Feuchtigkeit der Luft als Parameter auf, so ergibt sich bei den untersuchten Schimmelpilzen (*Penicillium flavo-glaucum*, *Mucor racemosus* und *Cladosporium herbarum*) ein im wesentlichen übereinstimmendes Bild (Abb. 3 auf Tafel I). Entsprechend dem Verlauf der *Rippel*schen Wachstumskurve (vgl. *Rippel*

[1] Die Dichte der Salzlösungen wurde mit einer Araeometerspindel eingestellt, die eine Ablesung auf $\pm$ 0,00025 g je Kubikzentimeter gestattete. Der Ablesefehler war also bei der Einstellung der Lösung mit der niedersten relativen Feuchtigkeit (85%) nur ein Bruchteil von 1%.

1925) ist die Flächenzunahme in den ersten Tagen gering, vergrößert sich dann ziemlich stark, um schließlich wieder kleiner zu werden. Da die Versuche nur bis zur Reife der Konidien bzw. Sporen fortgeführt wurden, fehlt bei einigen Kurven der letzte Abschnitt. Die Lage des Kurvenendes zeigt also an, in welchem Abschnitt der Wachstumskurve die Fortpflanzungszellen entstehen. Sinkende Temperatur und abnehmende Feuchtigkeit, ausgenommen das Gebiet zwischen $\varphi = 100\,\%$ und $\varphi = 95\,\%$, bewirkten in allen Fällen eine starke Verzögerung der Wachstumsvorgänge.

Mucor racemosus entwickelt die höchste Wachstumsgeschwindigkeit. Die Sporenbildung erfolgt so frühzeitig, daß nirgends der letzte Abschnitt der Wachstumskurve erreicht wird. *Cladosporium herbarum* zeigt entgegengesetztes Verhalten. Das Flächenwachstum geht langsam vor sich. Die Bildung der Konidien setzt erst ein, nachdem der Flächenzuwachs seinen Höchstwert überschritten hat. *Penicillium flavoglaucum* nimmt zwischen *Mucor* und *Cladosporium* eine mittlere Stellung ein. Die Konidienbildung erfolgt bei $+ 6^0$ C und hoher Feuchtigkeit im Abschnitt des stärksten Flächenwachstums. Mit sinkender Temperatur wird sie mehr und mehr in den letzten Abschnitt der Wachstumskurve verschoben.

Abnahme der relativen Feuchtigkeit der Luft unter den optimalen Wert führt bei allen Arten dazu, daß die Bildung der Fortpflanzungszellen gegen das Ende der Wachstumskurve rückt.

Durch den Einfluß der Temperatur wird das Wachstum bei den einzelnen Arten verschieden stark verzögert. Um in gleichen Zeiten dieselbe Pilzfläche zu erhalten, kann man bei *Mucor racemosus* bei 3^0 Temperaturerniedrigung die relative Feuchtigkeit um rund 15 bis 20 % heraufsetzen, bei *Penicillium glaucum* um ungefahr 10 %. *Cladosporium herbarum* gestattet nur eine Erhöhung um etwa 5 %. Bei *Cladosporium* wird bei allen Temperaturen die ganze Wachstumskurve durchlaufen, und die zuletzt vom Pilz bedeckte Fläche hat unabhängig von der Temperatur bei gleicher relativer Feuchtigkeit immer annähernd dieselbe Größe. Bei *Penicillium* ist unter entsprechenden Bedingungen die erreichbare Endfläche bei derselben relativen Feuchtigkeit um so kleiner, je niedriger die Lagertemperatur gehalten wird. Die direkte Wirkung der Temperatur ist also sehr ausgeprägt. *Mucor* bedeckt bei allen Temperaturen die größten Flächen, deren Endwerte sich jedoch aus den Wachstumskurven nicht abschätzen lassen.

Die Abhängigkeit des Flächenwachstums von der Temperatur wird besonders deutlich, wenn man bei gleicher Lagerzeit die vom Pilz bedeckten Flächen über der Temperatur aufträgt (Abb. 4). Die Flächenzunahme ist stärker als linear und bei hoher Luftfeuchtigkeit am größten.

Die Temperaturabhängigkeit ist bei *Mucor* am ausgeprägtesten, bei *Cladosporium*, dessen Kurven nur wenig gekrümmt sind, am schwächsten. Damit stimmen Angaben von *Brooks* und *Kidd* (1921) überein, die bei *Cladosporium* noch bei — 6° C Wachstum festgestellt haben.

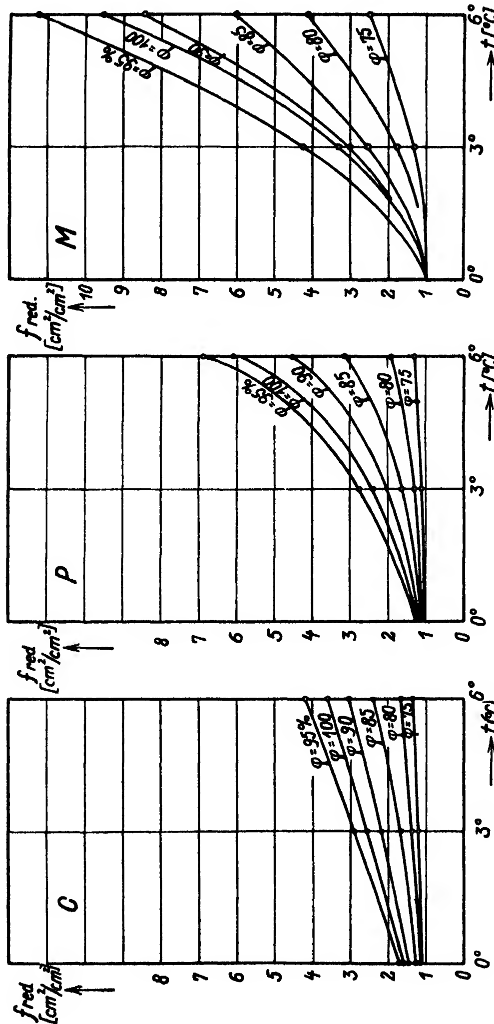


Abb. 4

Das Flächenwachstum in Abhängigkeit von der Temperatur.

C = *Cladosporium* (Lagerzeit 13 Tage). P = *Penicillium* (Lagerzeit 13 Tage).
M = *Mucor* (Lagerzeit 6 Tage).

Prüft man bei den einzelnen Temperaturen die Zeit, die erforderlich ist, bis die Pilze eine bestimmte Fläche überwachsen haben, so erweist sich im Temperaturbereich von ± 0° bis + 6° C *Mucor* als derjenige der untersuchten Schimmelpilze, der die Lagerzeit des

Fleisches am stärksten verkürzt (Abb. 5). Um eine Fläche von etwa 3 qcm zu überwachsen, braucht *M. racemosus* bei einer relativen Feuchtigkeit von 90 % selbst bei 0° nur 11 Tage, während bei *Penicillium* 30 und bei *Cladosporium* 32 Tage verstreichen.

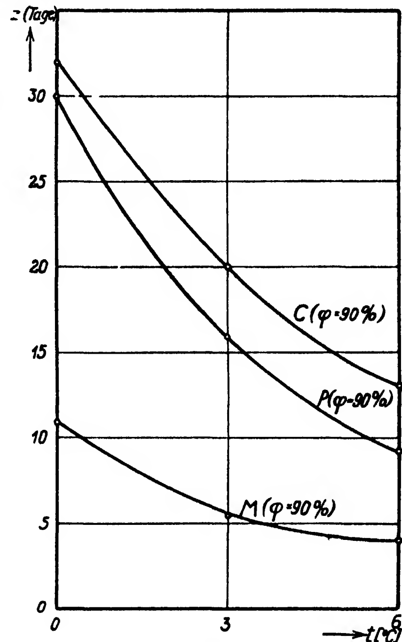


Abb. 5.
Der Einfluß der Temperatur auf die Entwicklung gleicher Pilzflächen.
Die Kurven geben an, welche Zeit bei den verschiedenen Temperaturen verstreicht, bis das Pilzmycel eine Fläche (f_{red}) von etwa 3 qcm bedeckt.
C = *Cladosporium*, *P* = *Penicillium*, *M* = *Mucor*, $\varphi = 90\,\%$.

Mit *Acaulium* haben wir keine Flächenmessungen ausgeführt, da die Wachstumsgeschwindigkeit selbst gegenüber *Penicillium* und *Cladosporium* erheblich zurückblieb.

Das Flächenwachstum weist in Abhängigkeit von der relativen Feuchtigkeit bei sonst gleichen Bedingungen ein Maximum auf, das bei unseren Versuchen bei etwa 95 % relativer Feuchtigkeit liegt (Abb. 6). Die Abnahme des Flächenwachstums bei 100 % Feuchtigkeit hat vermutlich zwei Ursachen. In wasserdampfgesattigter Luft treten wahrscheinlich Transpirationsstörungen auf, die auf den Stoffwechsel und das Wachstum verzögernd wirken. Unter dem Einfluß wasserdampfgesättigter Luft zeigen sich auch andere pathologische Erscheinungen. Einzelne Hyphen platzen. Bisweilen entstehen Riesenzellen. Das Luftmycel erscheint anfangs nur vereinzelt und verzögert. Besonders empfindlich scheint *M. racemosus* in dieser Beziehung zu sein. Mycelschädigungen durch hohe Feuchtigkeiten in Verbindung mit hohen Temperaturen hat *Schwartz* (1928) beobachtet.

Ferner ist es trotz aller Vorsichtsmaßregeln nicht zu vermeiden, daß bei sehr hoher Feuchtigkeit Bakterien, wenn auch in verhältnismäßig kleiner Zahl, zur Entwicklung gelangen. Die Konkurrenz der Bakterien kann ebenfalls das Flächenwachstum des Pilzes bei 100 % relativer Feuchtigkeit stören. Die Bakterienentwicklung dürfte auch die Ursache dafür sein, daß die Größe der gemessenen Flächen bei $\varphi = 100\,\%$ in einigen Fällen den Werten bei $\varphi = 90\,\%$ näher ist, während ohne diese Störung der tatsächliche Betrag wahrscheinlich näher bei dem Wert für $\varphi = 95\,\%$ liegt.

Unmittelbar an der Fleischoberfläche ist die Dampfspannung immer höher als über der Lösung, ausgenommen bei einer relativen Feuchtigkeit von 100 $^0/_0$, wo der Dampfdruck etwas geringer ist, da über Fleischsaft eine relative Feuchtigkeit von 99,3 % herrscht. Würde

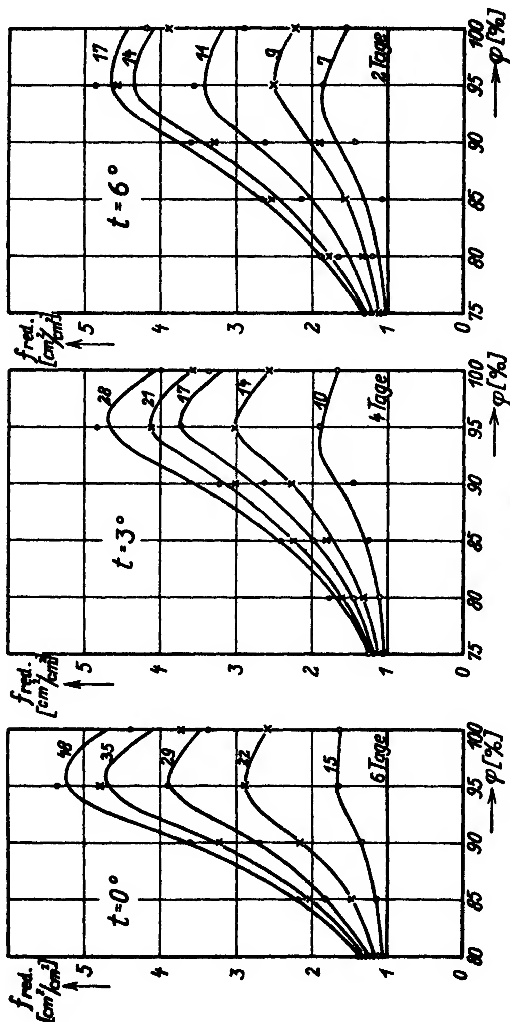


Abb. 6.

a) *Cladosporium herbarum.*

Das Flächenwachstum in Abhängigkeit von der relativen Feuchtigkeit der Luft mit der Lagerdauer als Parameter bei den Temperaturen $t = \pm 0^0$, $+ 3^0$, $+ 6^0$

man das Flächenwachstum der Schimmelpilze zu der relativen Feuchtigkeit unmittelbar an der Fleischoberfläche in Beziehung setzen, so würden die den Flächenwerten entsprechenden Beträge auf der Abszisse näher an $\varphi = 100$ % heranrücken mit Ausnahme des letzten Wertes ($\varphi = 100$ %), der an der Fleischoberfläche vermutlich über-

haupt nicht erreicht wird, da der theoretisch zu erwartende Ausgleich bei einer Luftfeuchtigkeit von $\varphi = 100\,\%$ praktisch nicht eintritt.

Das Maximum der Kurven wird dann zwischen 95 und 100 % liegen und bei *Mucor* dem 100 %igen Werte am nächsten sein. Unter-

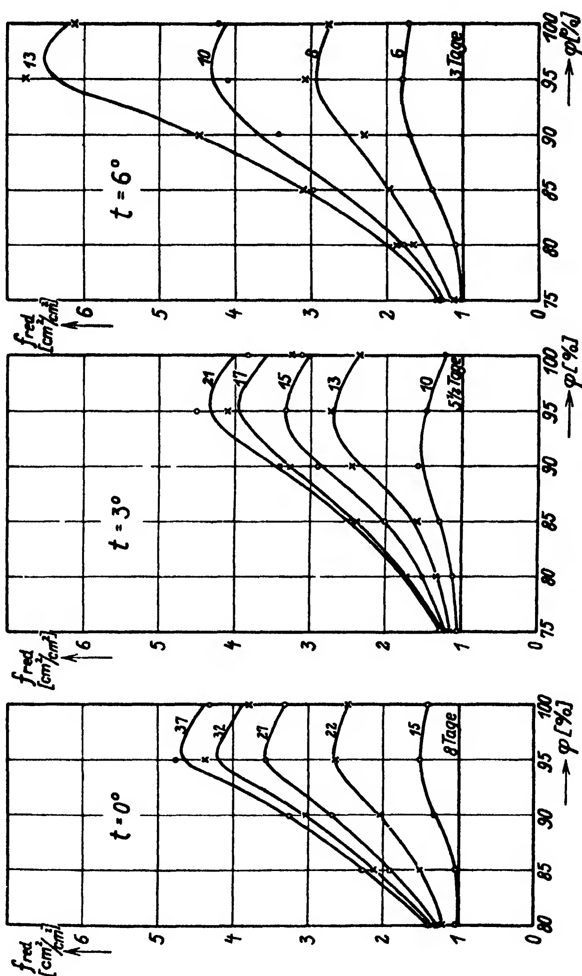


Abb. 6.

b) Penicillium flavo-glaucum.

Das Flächenwachstum in Abhängigkeit von der relativen Feuchtigkeit der Luft mit der Lagerdauer als Parameter bei den Temperaturen $t = \pm 0°, + 3°, + 6°$.

halb $\varphi = 95\,\%$ bewirkt die Abnahme der relativen Feuchtigkeit eine Abnahme im Wassergehalt des Substrats, die zu einem Rückgang in der Quellung der Eiweißkörper und einer Zunahme des osmotischen Druckes im Fleischsaft besonders in der Nähe der Oberfläche führt. Dadurch wird das Wachstum der Pilze allmählich immer mehr verzögert.

Zwischen $\varphi = 95$ und 100 % wirken die Erschwerung der Transpiration, die Schädigungen des Mycels und die zunehmende Konkurrenz der Bakterien hemmend. Das Wachstumsmaximum wird dann erreicht,

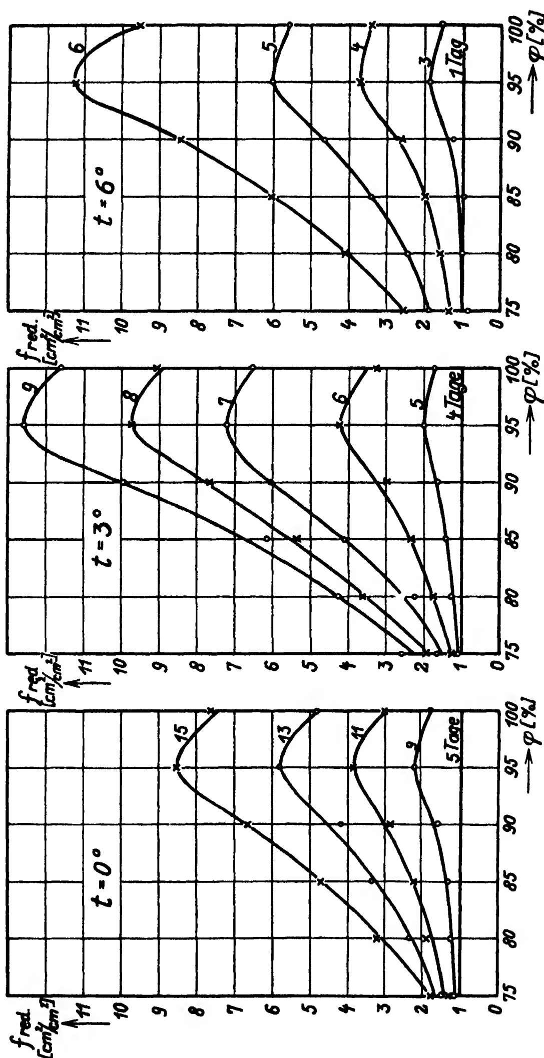


Abb. 6.

c) *Mucor racemosus.*

Das Flächenwachstum in Abhängigkeit von der relativen Feuchtigkeit der Luft mit der Lagerdauer als Parameter bei den Temperaturen $t = \pm 0°, + 3°, + 6°$.

wenn der Einfluß der hemmenden Faktoren über die Verbesserung der Wasserversorgung überwiegt.

Der Nachweis eines unterhalb 100 % gelegenen maximalen Wachstums, der mit ganz vereinzelten Ausnahmen in allen Reihen bereits

an Hand der gemessenen mittleren Flächen gelang, steht im Widerspruch zu *Walters*, und teilweise auch zu *Tomkins* Ergebnissen.

Eigentlich ergibt sich schon aus theoretischen Betrachtungen, daß ein solches Maximum vorhanden sein muß. Ein Nährstoffgemisch, das sich mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % im Gleichgewicht befindet, müßte die Nährstoffe in unendlicher Verdünnung enthalten und würde auf Mikroorganismen nicht anders wie destilliertes Wasser wirken. Es muß also in der Nähe des 100 %-Punktes der Abszisse ein steiler Abfall der Kurve erfolgen. Der Nachweis dieser Erscheinung in ihrem vollen Ausmaß stößt auf große experimentelle Schwierigkeiten, die in der Versuchsmethodik liegen. Gegenüber den Versuchen, den Einfluß verschiedener osmotischer Drucke durch Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen zum Nährsubstrat zu prüfen, hat die Methode, das Nährsubstrat einer bestimmten relativen Luftfeuchtigkeit auszusetzen, den großen Vorteil, daß chemische Nebenwirkungen ausgeschaltet werden und die absolute Menge der Nährstoffe in jedem einzelnen Versuch gleich groß ist. Der Nachteil liegt darin, daß die Gleichgewichte sich nur langsam einstellen, und daß die höchsten Feuchtigkeiten bestenfalls in den Zonen erreicht werden, in denen sich das Luftmycel entwickelt.

Tomkins hat den Nähragar vor seinen Versuchen eingetrocknet und dann beimpft. Die Wachstumsvorgänge laufen also neben dem Wasserausgleich her, der hier vielleicht besonders langsam vonstatten geht, da so stark getrocknete Quellkörper nur langsam das Wasser wieder aufnehmen. Es liegt die Annahme nahe, daß zur Zeit der Messungen die angegebenen Dampfspannungen an der Oberfläche des Substrates noch nicht erreicht waren und infolgedessen der an $\varphi = 100\,\%$ grenzende Feuchtigkeitsbereich in den Versuchen überhaupt nicht erfaßt wurde. Messungen auf dem gleichen, jedoch nicht vorgetrockneten Nähragar ergaben bei samtlichen relativen Feuchtigkeiten auch tatsächlich stets höhere Werte als auf vorgetrocknetem Agar.

Das Ergebnis der Versuche mit verschiedenem Wassergehalt der Substrate ist schwer verständlich. Es wird zwar mit steigendem Wassergehalt des Substrates ein Maximum erreicht, das jedoch in trockener und feuchter Luft bei auffällig niedrigen Wassergehalten des Substrates liegt. Außerdem ist auffällig, daß die Kurve für trockene Luft in einigen Fällen teilweise über der Kurve für feuchte Luft verläuft.

Walters Kurven für Pilze verlaufen in der Nähe von $\varphi = 100\,\%$ parallel zur Abszisse. Berücksichtigt man die Lage der einzelnen Punkte (1924, Abb. 4 bis 7), so zeigt sich, daß die Werte für $\varphi = 100\,\%$ bei einem Teil der Reihen wieder niedriger liegen als bei den vorhergehenden Feuchtigkeiten. *Walter* erblickt darin eine zufällige Erscheinung. Als

Maß für das Wachstum benutzt *Walter* den Durchmesser der Kolonie. Es erscheint uns richtiger, das Quadrat des Durchmessers oder noch besser die Fläche aufzutragen, da der Verlauf des flächenförmig erfolgenden Wachstums durch eine lineare Funktion nie richtig ausgedrückt werden kann. Unter diesen Umständen werden die Abweichungen von *Walters* Kurve bei $\varphi = 100\%$ erheblich größer. Auch *Tomkins* hat bei einem Teil seiner Versuche den Durchmesser der Kolonie als Maß für das Wachstum benutzt.

Eine endgültige Klärung der Wachstumsverhältnisse zwischen $\varphi = 95$ und 100% müßte also bei Bedingungen erfolgen, die ein vollständiges Gleichgewicht der Dampfdrucke über der Salzlösung und über dem Nährsubstrat gewährleisten.

Störungen im Wachstum treten übrigens auch bei Feuchtigkeiten von 85 % auf. Das Mycel wird gedrungener, Verzweigungen sind abnorm häufig, und die Hyphen zeigen häufig unregelmäßige Gestalt. *Cladosporium* bildete oft stark gekammertes dickwandiges Mycel, dessen Glieder den Eindruck von Dauerzellen machten. Dagegen war der Einfluß der Temperatur auf den Bau des Mycels sehr gering. Nur bei *M. racemosus* fiel auf, daß bei 0° das Mycel etwas gedrungener ist.

2. *Sporen- und Konidienbildung.*

Ebenso wie das Flächenwachstum wird auch die Bildung der Fortpflanzungszellen durch Temperatur und relative Feuchtigkeit beeinflußt. Auch hier treten in wasserdampfgesättigter Luft Störungen auf, die sich im Auswachsen der Konidienträger oder in einer vorzeitigen Keimung von Konidien und Sporen äußern. Die Auswertung der Ergebnisse wurde durch die starke Streuung der einzelnen Zählungen erschwert, die im Durchschnitt $\pm 25\%$ des Mittelwertes ausmacht. Neben den in der Methode der Zählung liegenden Schwierigkeiten kommt in der großen Streuung vielleicht auch zum Ausdruck, daß die drei Pilzarten bei niederen Temperaturen keine optimalen Bedingungen für die Bildung der Sporen und Konidien mehr antreffen, so daß tatsächlich auch stärkere Unterschiede im Verhalten von Parallelkulturen vorhanden sind. Die Mittelbildung hat trotz dieser Einschränkung immer zu Werten geführt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Bild der wirklichen Verhältnisse geben. Trägt man die nach verschieden langer Zeit festgestellten Konidien- und Sporenzahlen über der relativen Feuchtigkeit auf, so ergeben sich Kurven, die den gleichen Charakter wie die für das Flächenwachstum (vgl. Abb. 6) aufweisen (Abb. 7). Auch hier liegt ein Maximum bei etwa 95 % relativer Feuchtigkeit. Der Abfall der Kurven mit abnehmender Feuchtigkeit ist sehr steil.

Der Einfluß der Temperatur ist bei *Cladosporium* so stark, daß sich bei $\pm 0°$ selbst nach 48 Tagen Lagerzeit und bei hoher Feuchtigkeit im mikroskopischen Präparat nur vereinzelte Konidien nachweisen

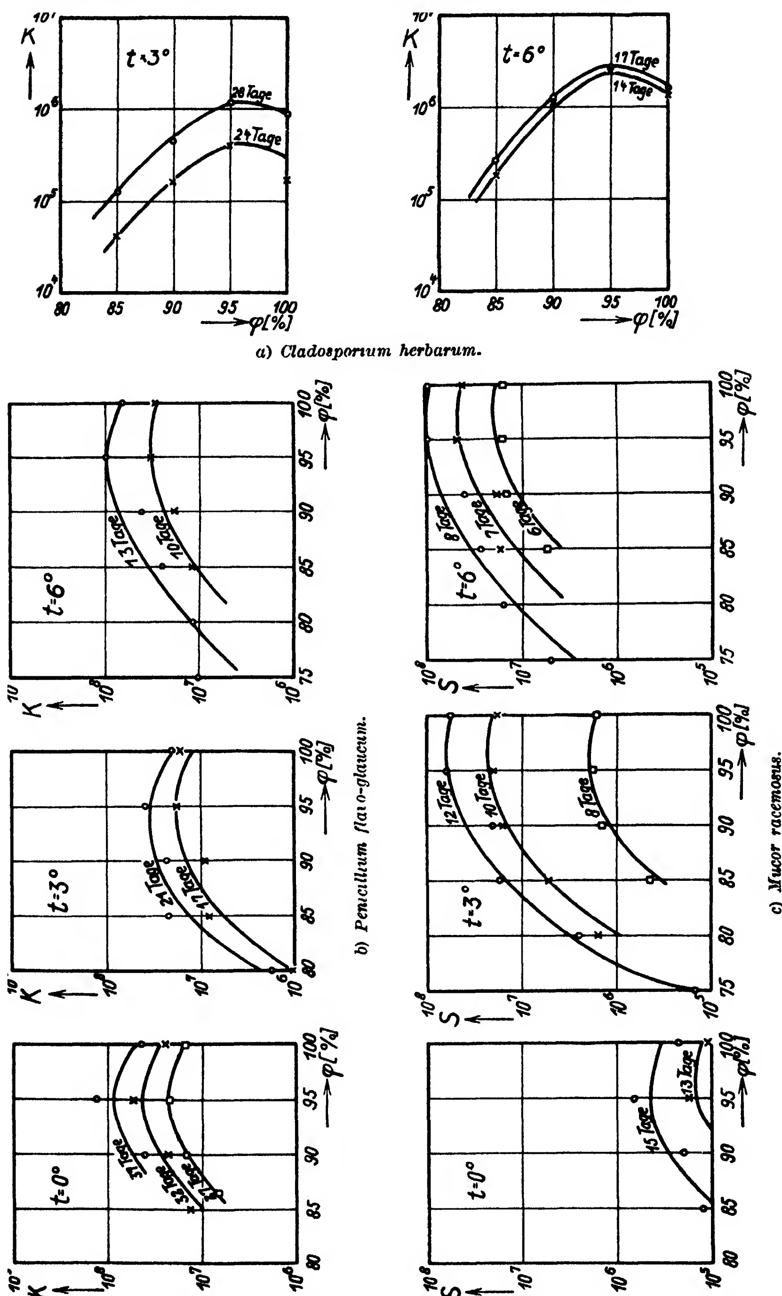


Abb. 7. Konidien- und Sporenbildung bei verschiedenen Temperaturen und relativen Luftfeuchtigkeiten. Die Kurven geben die gesamte Zahl der nach einer bestimmten Lagerzeit vorhandenen Fortpflanzungszellen an.

lassen. Eine Zählung ist nicht mehr möglich. *Brooks* und *Kidd* (1921) haben übereinstimmend gefunden, daß bei Temperaturen unter ± 0° die Konidienbildung sehr schwach ist oder überhaupt unterbleibt.

Die mittlere Dichte der Konidien und Sporen ergibt sich, wenn man die Konidien- und Sporenzahlen durch die dazugehörende Pilzfläche dividiert (Tabelle II). Auch hier ist das Vorhandensein einer maximalen Dichte im Bereich von $\varphi = 95\,\%$ sehr wahrscheinlich.

Tabelle II.

Beispiel für die Ermittlung der Konidienzahl und der mittleren Dichte der Konidien.

[*Penicillium flavo-glaucum.* $t = 0°$ C.]

φ %	Tage	Konidienzahl: Einzelwerte K	Konidienzahl: Mittelwerte $K_m = \frac{\Sigma K_n}{n}$	Streuung	Zugehorige Fläche F qcm	Dichte: $D = K/F$	Dichte: Mittelwert $D_m = \frac{\Sigma D_n}{n}$
100	27	1,09 . 10⁷	1,85 . 10⁷	± 0,41	4,62	2,37 . 10⁶	5,40 . 10⁶
100		2,62			3,11	8,43	
95		2,93	3,03	± 0,04	5,28	5,55	6,65
95		3,13			3,99	7,85	
90		1,75	1,64	± 0,07	2,93	5,98	5,46
90		1,53			3,05	4,93	
85		0,50	0,56	± 0,11	2,11	0,37	0,33
85		0,62			2,11	0,30	
100	32	3,81	4,07	— 0,07	3,65	10,50	10,70
100		3,96		— 0,03	3,60	11,00	
100		3,46		— 0,15	3,95	8,76	
100		5,05		+ 0,25	4,01	12,60	
95		8,74	7,37	± 0,18	5,50	15,90	14,40
95		6,01			4,68	12,80	
90		3,02	3,67	± 0,22	3,44	8,80	10,30
90		4,35			3,65	11,90	
85		1,65	1,42	± 0,18	2,95	5,60	4,84
85		1,20			3,00	4,07	
100	37	6,96	6,56	± 0,06	4,85	11,90	11,20
100		6,16			5,90	10,50	
95		13,83	11,20	± 0,23	6,90	20,00	17,30
95		11,77		— 0,15	6,87	17,10	
95		9,55		— 0,15	6,00	15,90	
95		9,75		— 0,13	6,03	16,20	
90		10,03		+ 0,58	3,56	28,20	
90		8,70		+ 0,31	3,59	23,10	
90		3,71	6,35	— 0,42	3,85	9,60	17,40
90		3,36		— 0,47	3,95	8,52	

3. *Die Keimzeiten.*

Die Versuche in feuchten Kammern mit Fleischsaft als Substrat sollten Aufschluß geben, wie der Verlauf der Quellung und der Keimung

bis zum Auswachsen des Keimschlauchs von Temperatur und relativer Feuchtigkeit beeinflußt wird (Abb. 8).

Im Gegensatz zu den Kurven für das Flächenwachstum und für die Konidien- und Sporenzahlen fehlt hier ein Maximum. Die Keim-

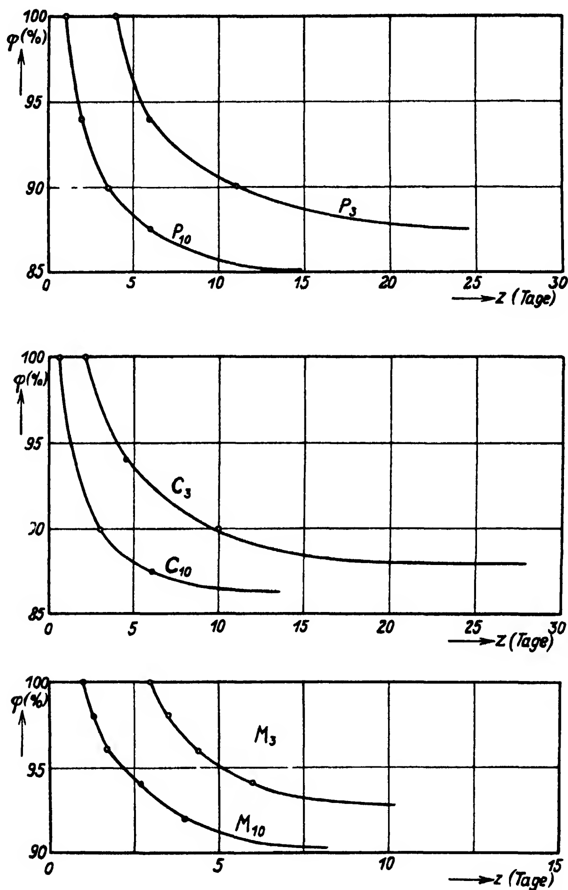


Abb. 8.
Keimzeiten in Abhängigkeit von der relativen Feuchtigkeit und von der Temperatur.
C = *Cladosporium*, *P* = *Penicillium*, *M* = *Mucor*.
(Die Indizes geben die Temperatur an.)

zeit sinkt mit zunehmender Feuchtigkeit stets und erreicht ihren niedrigsten Wert bei $\varphi = 100\,\%$. Die Kurven nähern sich asymptotisch dem Grenzwert, d. h. der Feuchtigkeit, die gerade noch Keimung zuläßt (Tabelle III). Mit steigender Temperatur wird innerhalb des hier geprüften Bereiches bei allen drei Arten die Grenzfeuchtigkeit geringer. Die sichere Vermeidung von Schimmelpilzen hätte somit

die Anwendung einer Oberflächenfeuchtigkeit des Lagergutes von mindestens 85 % zur Voraussetzung. Auch eine wirksame Verzögerung der Keimung erfordert schon eine recht trockene Oberfläche.

Tabelle III.
Die relative Feuchtigkeit als begrenzender Faktor bei der Keimung.

Art	Temperatur °C	Grenzfeuchtigkeit %
Penicillium flavo-glaucum	+ 10	85
	+ 3	87
Cladosporium herbarum	+ 10	86
	+ 3	88
Mucor racemosus	+ 10	91
	+ 3	93

4. Das Wachstum von Schimmelpilzen und die Festsetzung der Lagerzeit für Kuhlfleisch.

Die Qualitätsverminderung, die durch das Auftreten von Schimmelpilzen hervorgerufen wird, ist durch die Verschlechterung des Aussehens und des Geruches und durch Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Fleisches bedingt. Solange der Pilz erst ein hyalines, nur mikroskopisch erkennbares Mycel entwickelt hat, wird der Handelswert nicht vermindert, und die Fleischoberfläche behält ihre ursprüngliche Beschaffenheit bei. Erst wenn ein sichtbarer weißer oder grauer Schimmelrasen entstanden ist (vergleiche Abb. 2a), setzt die Wertminderung ein. Dieser Zeitpunkt und die Reife der Fortpflanzungszellen sind die beiden Abschnitte in der Entwicklung des Pilzes, denen die größte praktische Bedeutung zukommt. Der Einfluß der Feuchtigkeit auf den ersten Entwicklungsabschnitt ist gering, da sich Konzentration und Quellungszustand an der Fleischoberfläche

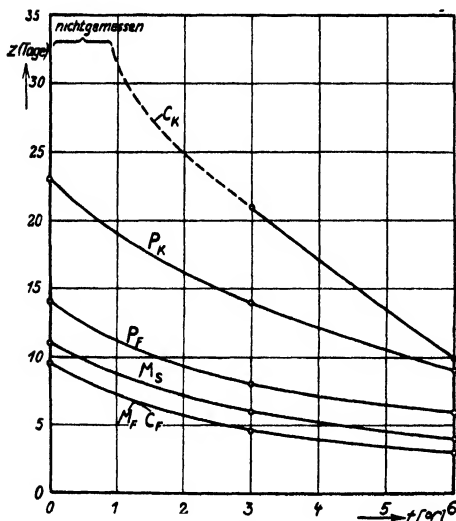


Abb. 9.
Sichtbarwerden der Infektion und Reife der Sporen und Konidien in Abhängigkeit von der Temperatur.
C = *Cladosporium*, *M* = *Mucor*, *P* = *Penicillium*.
Die Indizes bedeuten: *F* = Sichtbarwerden des Mycels, *S* und *K* = Beginn der Sporen- bzw. Konidienreife.

Tabelle IV.

Zeiten für das Sichtbarwerden des Impfstreifens und für den Eintritt der Konidien- bzw. Sporenreife.

		Penicillium flavo-glaucum		*Cladosporium herbarum*		*Mucor racemosus*	
		Sichtbarwerden des Mycels Tage	Beginnende Konidienreife Tage	Sichtbarwerden des Mycels Tage	Beginnende Konidienreife Tage	Sichtbarwerden des Mycels Tage	Beginnende Sporenreife Tage
$\varphi = 100\%$	0° C	15	24	10	—	11	11—12
	3	9	15	5	23	6	6
	6	6	9	3	11	3	4
$\varphi = 95\%$	0	14	23	9	—	10	11
	3	8	14	5	21	5	6
	6	6	9	3	10	3	4
$\varphi = 90\%$	0	14	23	9	—	9—10	11
	3	8	14	5	21	4— 5	6
	6	6	9	3	10	3	4
$\varphi = 85\%$	0	14	24	9	—	9—10	11
	3	8	14	5	—	4— 5	6
	6	6	9	3	13	3	4
$\varphi = 80\%$	0	14	26	9	—	9—10	11
	3	8	16	5	—	4— 5	6
	6	6	11	3	—	3	4
$\varphi = 75\%$	0	—	—	9	—	9—10	11—12
	3	8	—	5	—	4— 5	6— 7
	6	6	—	3	—	3	4— 5

noch nicht erheblich geändert haben (Tabelle IV). Im praktischen Kühlbetrieb wird wegen des günstigeren Verhältnisses von Oberfläche zu Gewicht der Eintritt der Luftmycelbildung noch weniger von der relativen Feuchtigkeit der Raumluft abhängig sein, so daß man, ohne einen merklichen Fehler zu begehen, deren Einfluß vernachlässigen kann. Auch die Reifung der Konidien oder Sporen scheint durch eine Änderung der relativen Feuchtigkeit zeitlich nur wenig beeinflußt zu werden (Tabelle IV). Größere Abweichungen von dieser Regel, die bei $\varphi = 75\%$ beobachtet wurden, sind deshalb unberücksichtigt geblieben. Trägt man die Anzahl Tage, nach denen Luftmycelbildung bzw. Konidienreife für die einzelnen Arten einsetzen, als Funktion der Temperatur auf (Abb. 9), so ergibt sich, daß *Mucor* und *Cladosporium* die geringste Zeit bis zum Sichtbarwerden des Rasens brauchen und ungefähr gleichzeitig erscheinen, was bei *Cladosporium* auffällig ist, da diese Art sich durch besonders langsames Wachstum auszeichnet. Bei *Penicillium* ist das Sichtbarwerden etwas verzögert. Der Beginn der Sporenreife fällt bei *Mucor* fast mit dem Erscheinen des Luftmycels zusammen, während bei *Penicillium* reife Konidien erst nach Lagerzeiten auftreten, die man als die Grenze dessen ansehen kann, was heute bei der Frischhaltung von Kühlfleisch

erreicht wird. Bei *Cladosporium herbarum* ist die Konidienreife noch weiter hinausgeschoben.

Die Begrenzung der Lagerzeit von Kühlfleisch durch das Auftreten der Bakterien haben *Schwartz* und *Schmid* (1931) untersucht. Überwiegt die Infektion durch Schimmelpilze, so ist das Auftreten der mit bloßem Auge sichtbaren Luftmycelrasen für die Länge der Lagerzeit bestimmend. Es erlangen also diejenigen Pilzarten besondere Bedeutung, die zuerst erscheinen und sich am raschesten ausbreiten, was bei unseren Versuchen für *Mucor racemosus* zutrifft. Die übrigen auf Fleisch vorkommenden *Mucorineen* verhalten sich vermutlich ähnlich. *Mucorineen* sind gegen eine Änderung der relativen Feuchtigkeit an der Substratoberfläche sehr empfindlich; es erscheint also zunächst aussichtsreich, die schädlichste Pilzgruppe durch Senkung der relativen Feuchtigkeit an der Fleischoberfläche auszuschalten. In der Praxis ist diese Maßnahme auf Grund unserer Versuche jedoch nicht durchführbar, da die erforderliche Senkung der relativen Feuchtigkeit der Kühlhausluft zu starken Veränderungen am Fleisch führen würde (Gewichtsverlust, Verfärbung usw.).

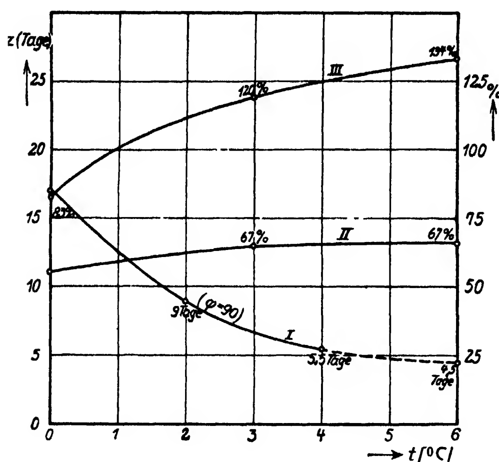


Abb. 10.

Begrenzung der Lagerzeit durch *Mucor racemosus* und *Penicillium flavo-glaucum*.
Kurve I: Lagerzeit bei *Bakterien*-Infektion nach *Schwartz* und *Schmid* (1931).
Kurve II: Zeit in Tagen, die bis zum Sichtbarwerden der *Mucor*-Infektion verstreicht (vgl. Abb. 9), ausgedrückt in % der Lagerzeit bei Bakterien-Infektion.
Kurve III: Dasselbe für *Penicillium*.

Dagegen wäre eine Reinigung der Luft von den Sporen und Konidien durch Filtration möglich. Auch durch Luftumwälzung ließe sich vielleicht die Entwicklung der Pilze und Bakterien verzögern. Ebenso bleibt noch zu untersuchen, ob eine Abtötung von Bakterien und Pilzkeimen, etwa durch Zusatz von Ozon zur Kühlhausluft, gelingt, ohne daß diese Behandlung zu unerwünschten Veränderungen am Kühlgut führt.

Drückt man die Zeit, die bei *Mucor racemosus* bei der technisch wichtigsten relativen Feuchtigkeit $\varphi = 90\,\%$ bis zum Erscheinen der Pilzrasen verstreicht, in Prozenten der von *Schwartz* und *Schmid* ermittelten Lagerzeit aus (Kurve II, Abb. 10), so erhält man eine Kurve, die zwischen $+\,6^0$ und $+\,3^0$ C fast horizontal verläuft und dann gegen

0^0 etwas abfällt. Die entsprechende Kurve für *Penicillium flavo-glaucum* (III) zeigt etwas steileren Verlauf. Aus diesen Kurven ergibt sich, daß mit abnehmender Temperatur die Entwicklung von Schimmelpilzen auf die Festsetzung der Lagerzeit immer mehr Einfluß gewinnt. Durch *Mucor racemosus* wird bereits bei + 6^0 C die Lagerzeit gegenüber reiner Bakterieninfektion auf etwa 67 % gekürzt. *P. flavo-glaucum* wirkt verkürzend erst von etwa + 1^0 C an abwärts. Damit stimmt überein, daß nach *Haines* (1931) und *Prescot* (1932) Bakterien unter 0^0 bedeutend in ihrer Entwicklung gehemmt sind. Die praktische Erfahrung bestätigt, daß Schimmelpilze in der Gefrierfleischlagerung die Hauptschädlinge sind.

IV. Zusammenfassung.

Die Entwicklung von Schimmelpilzen wurde bei verschiedenen für die Kaltlagerung von Fleisch wichtigen Luftzuständen zunächst in ruhender Luft an einigen typischen Arten untersucht und führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Flächenwachstum, Konidien- und Sporenzahl ergeben bei graphischer Darstellung, mit der Feuchtigkeit der Luft als Abszisse aufgetragen, Kurven mit einem Höchstwert bei etwa $\varphi = 95\,\%$.

2. Der Abfall der Kurven vom Maximum in Richtung zunehmender Feuchtigkeit ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß das Wachstum durch Transpirationsschwierigkeiten und durch die steigende Entwicklung von Bakterien gehemmt wird, deren Auftreten bei hohen Feuchtigkeiten nicht ganz verhindert werden kann.

3. Der Einfluß von Temperatur und Feuchtigkeit auf die Wachstumsgeschwindigkeit ist bei den einzelnen Pilzarten verschieden. Bei einer Senkung der Temperatur um 3^0 kann zur Erzielung gleicher Lagerzeit und gleichen Flächenwachstums die relative Feuchtigkeit um 5 bis 20 % heraufgesetzt werden.

4. *Mucor racemosus* keimt und wächst am schnellsten. Da bei der Infektion des Fleisches fast stets *Mucorineen* beteiligt sind, werden diese bei vorwiegendem Auftreten von Schimmelpilzen für die Begrenzung der Lagerzeit bestimmend sein.

5. Der Charakter der Kurven wird sich auch dann nicht ändern, wenn die Entwicklung der Schimmelpilze bei gleichen Bedingungen, anstatt auf den kleinen Versuchsstücken, auf größeren Fleischstücken erfolgt, wie sie bei der praktischen Kaltlagerung vorliegen. Will man die Ergebnisse der Versuche auf die Praxis übertragen, so genügt es, für einzelne Wachstumsabschnitte einen konstanten Faktor zu bestimmen, mit dem die experimentell ermittelten Flächenwerte der Schimmelpilze oder die Konidien- oder Sporenzahlen zu multiplizieren sind. Dieser Faktor ist wahrscheinlich bei Luftfeuchtigkeiten über 95 % ungefähr gleich 1 und unter 95 % größer als 1.

6. Eine Ausdehnung der Ergebnisse auf andere, hier nicht untersuchte, auf Fleisch vorkommende *Mucorineen, Aspergillaceen* und *Schwärzepilze* wird möglich sein, ohne daß wesentliche Abweichungen zu befürchten sind. Die Ergebnisse dürften also für die praktische Kaltlagerung genügend Hinweise enthalten.

7. Die Keimungsversuche im hängenden Tropfen haben Grenzfeuchtigkeiten ergeben, deren Herstellung an der Oberfläche des Kühlgutes die Anwendung von Luftfeuchtigkeiten verlangen würde, die zu einem erheblichen Gewichtsverlust führen müßten.

8. Unsere Versuche beziehen sich auf Fälle, bei denen die Infektion der Schimmelpilze über die der Bakterien überwiegt. Unter diesen Umständen erfährt die Lagerdauer für Fleisch gegenüber den bei reiner Bakterieninfektion gefundenen Werten eine starke Verkürzung.

9. Auf Kühlfleisch läßt sich eine vollständige Verhütung der Entwicklung von Schimmelpilzen innerhalb der heute üblichen Lagerzeiten allein durch Regelung des Luftzustandes nicht erreichen, da zu starke Senkung der Feuchtigkeit die ursprüngliche Beschaffenheit des Fleisches ungünstig verändern würde.

V. Literatur.

Berger, Deutsch. tierärztl. Wochenschr. **20**, 59, 1912. — *Bidault*, Zeitschr. f. d. ges. Kälteind. **30**, 9, 1923. — *Ph. Biourge*, Les Moisissures du groupe *Penicillium Link*. „La Cellule" **33**, 1, 1923. — *F. T. Brooks* u. *M. N. Kidd*, Zeitschr. f. d. ges. Kälteind. **28**, 121, 1921. — *F. T. Brooks* u. *C. G. Hansford*, Transact. Mycol. Soc. 8, 1923. — *R. B. Haines*, Bull. Intern. de Renseignements Frigorifiques **12**, 1199, 1931. — *R. Heise*, Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt **50**, 204, 1917. — *R. Heiss*, „Die Wärme", Zeitschr. f. Dampfkessel u. Maschinenbetrieb **56**, 72, 1933. — *M. Hirsch*, Zeitschr. f. d. ges. Kälteind. **34**, 96, 1927. — *A. Janke* u. *H. Zikes*, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Leipzig 1928. — *W. Kehl*, Zeitschr. f. d. ges. Kälteind. **40**, 1, 1933. — *K. Linge*, ebenda **36**, 189, 1929. — *R. Plank* u. *E. Kallert*, Abhandl. zur Volksernährung, Heft 6, Berlin 1916. — *S. Prescot*, Refr. Engin. **23**, 91, 1932. — *L. Rabenhorst*, Kryptogamenflora, **1**, 4. Abt., Leipzig 1892. — *Derselbe*, ebenda **1**, 8. Abt., Leipzig 1907. — *L. Rasmusson*, Die Lebensmittel und ihre Aufbewahrung. Hannover 1931. — *A. Rippel*, Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen. Freising-München 1925. — *Derselbe*, Das Ertragsgesetz, Handb. d. Pflanzenernährung u. Düngerlehre. Berlin 1931. — *W. Schwartz*, Flora, N. F., **23**, 386, 1928. — *W. Schwartz* u. *W. Schmid*, Arch. f. Mikrobiol. **2**, 568, 1931. — *W. Tamm*, Beih. z. Zeitschr. f. d. ges. Kälteind., Reihe **3**, H. 4, 1930; 4, H. 4, 1930. — *A. Thiele*, Deutsch. Schlachthof-Ztg. **32**, 147, 1932. — *Ch. Thom*, The *Penicillia*, London 1930. — *R. G. Tomkins*, Rep. of the Food Investigation Board 1928, S. 41. — *Derselbe*, Proc. of the Roy. Soc. B, **105**, 375, 1929. — *H. Walter*, Zeitschr. f. Bot. **16**, 353, 1924. — *Derselbe*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Teil A, **6**, 65, 1926. — *Derselbe*, Die Hydratur der Pflanze. Jena 1931.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

Beiträge zur Kenntnis der Cellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung.

Von

Rudolf Meyer.

Mit 21 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. November 1933.)

Bei der bakteriellen Cellulosezersetzung unterscheidet man eine „aerobe" von einer „anaeroben", eine bei der Sauerstoffspannung der Luft vor sich gehende von einer unter erheblich verminderter Sauerstoffspannung erfolgenden. Die Bezeichnungen „aerob" und „anaerob" werde ich im folgenden nicht benutzen, da sie, wie *Zycha*[1] gezeigt hat, und wie wir auch unten sehen werden, den sachlichen Zusammenhängen nicht vollständig gerecht werden. Die folgenden Untersuchungen befassen sich allein mit der Cellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung.

Die Literatur über diese Cellulosezersetzer ist an anderen Stellen ausführlich genannt (altere bei *Omeliansky*[2], *Kellerman-Mc Beth*[3], neuere bei *Clausen*[4], *Werner*[5] und *Cowles-Rettger*[6]), so daß ich hier nur die wichtigsten Arbeiten, die zu den folgenden Fragen unmittelbare Beziehung haben, kurz zu referieren brauche.

Die grundlegende Arbeit über die Cellulosezersetzung bei niedriger Sauerstoffspannung hat *Omeliansky*[2] geliefert; er hat dabei besonders die stoffwechselphysiologischen Vorgange untersucht und unterscheidet darnach eine Wasserstoffgarung von einer Methangarung, verursacht durch je ein besonderes Bakterium. Die bei beiden Gärungen trommelschlegelförmigen Bakterien, bei denen die Sporen in der endständigen Anschwellung entstehen, sind morphologisch wenig voneinander verschieden. In jungen Stadien sind es Stäbchen ohne Anschwellung, die fast niemals Ketten bilden. Besondere Färbbarkeit mit Jod besteht nicht.

Nach den Untersuchungen anderer Autoren erscheint die Einteilung *Omelianskys* in zwei verschiedene Arten der Cellulosegärung bedenklich. Aber auch schon *Omelianskys* eigene Versuche wirken — obwohl sonst mit vorbildlicher Gewissenhaftigkeit ausgeführt — in dieser Beziehung nicht überzeugend; denn es ist doch auffallend, daß aus der Mischung einer Methan- und einer Wasserstoffkultur — auch in der Wiederholung — ausschließlich eine *reine* Methangarung und keine Mischgärung entstand, obwohl andererseits gerade der Wasserstoffbazillus, z. B. gegenüber Hitze,

[1] Diese Zeitschr. 8, 194, 1932. — [2] Centralbl. f. Bakt. II, 8, 193, 1902. — [3] Ebenda 34, 485, 1912. — [4] Ebenda 84, 20, 1931. — [5] Ebenda 67, 297, 1926. — [6] J. of Bact. 21, 67, 1931.

widerstandsfähiger ist. Die Annahme eines hitzeempfindlichen Begleiters, der erst aus den Stoffwechselprodukten des alleinigen Wasserstoffbazillus das Methan erzeugt, hätte diese Erscheinung ungezwungener erklärt[1]. Selbstverständlich besteht aber trotzdem die Möglichkeit, daß in dem besonderen Ausgangsmaterial, welches *Omeliansky* benutzt hat, verschiedenartige cellulosezersetzende Bakterien vorkommen[2]. Reinkulturen von seinen Cellulosezersetzern hat *Omeliansky* eindeutig nicht erhalten können.

Kellerman und *Mc Beth*[3] haben aus Material *Omelianskys* von 1911 drei verschiedene, unter höherer Sauerstoffspannung gedeihende Cellulosezersetzer isoliert, die kein Gas zu bilden vermögen. *Omeliansky*[4] zweifelt diese Ergebnisse an. In einer weiteren Mitteilung[5] beschreiben dieselben Autoren eine ganze Reihe von Cellulosezersetzern, die alle fast auf Anhieb isoliert wurden. Wer die Schwierigkeiten kennt, die mit der Reinzüchtung der Cellulosezersetzer verbunden sind, wird solchen Angaben nur mit äußerster Skepsis gegenüberstehen können.

Die bedeutendste Arbeit auf dem Gebiete der Cellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung ist wohl die von *Khouvine*[6]. Es gelang dieser Forscherin mit Hilfe des Waschverfahrens zum ersten Male, wirkliche Reinkulturen des Cellulosezersetzers zu erhalten. Das aus verschiedenen Substraten herausgezüchtete Bakterium gleicht in mancher Hinsicht dem von *Omeliansky* beschriebenen, und es ist wohl kaum daran zu zweifeln, daß es sich bei der Vielseitigkeit seines Auftretens um denselben Organismus handelt. *Khouvine* findet kürzere (jüngere) sporenlose und längere (ältere) Stäbchen mit endständiger Spore in einer Anschwellung; beide Formen sind niemals beweglich, zuweilen sitzen sie zu zweien, niemals aber in Ketten aneinander. Die Stäbchen färben sich mit gewöhnlichen Farbstoffen an, aber nicht gleichmäßig, sondern granuliert (vgl. S. 194). Das Wachstum erfolgt bei einer Sauerstoffspannung bis zu höchstens 7 mm; bei 12 mm ist das Wachstum sistiert. Das Temperaturoptimum liegt bei 37° C, das Maximum bei 67° C. Die Cellulosefaser wird entweder allgemein unter Gelborangefärbung oder in einzelnen Punkten angegriffen. Die Sporen sind sehr hitzebeständig, sie ertragen 100° C 45 bis 50 Minuten lang. In Fleischwasser bildet das Bakterium sporenlose Stäbchen, wobei das Vermögen zur Farbstoffbildung verloren geht. Sonst sind organische Substanzen im allgemeinen nicht als Kohlenstoffquelle verwertbar; dagegen erfordert die mineralische Nährlösung einen Zusatz von Fäkalextrakt, um normales Wachstum zu gewährleisten.

Weiter ist in diesem Zusammenhang noch eine Abhandlung von *Tetrault*[7] bemerkenswert. Sie befaßt sich allerdings mit „thermophilen" Cellulosezersetzern, deren Temperaturoptimum über 60° C liegt, die sich

---

[1] *Van Senus* (Bijdrage tot de kennis der cellulosegisting. Leiden 1890) kommt auf Grund seiner Ergebnisse zu der Annhme, daß bei der Cellulosegärung als gasförmige Bestandteile außer Kohlendioxyd nur Wasserstoff entsteht. Von *Omeliansky* wird die Stichhaltigkeit dieser Versuche aber angezweifelt — [2] *Rubentschik* (Centralbl. f. Bakt. II, 88, 182, 1933) gibt z. B. an, aus dem Schlamm des Kujalnizki-Liman bei Odessa ein dem *Omeliansky*schen Methanbazillus nahestehendes, halotolerantes Bakterium isoliert zu haben; die Methanbildung blieb aber auch nach 20 Minuten langer Erhitzung auf 80° C bestehen. — [3] Centralbl. f. Bakt. II, **34**, 485, 1912. — [4] Ebenda **36**, 472, 1913. — [5] Ebenda **39**, 502, 1914. — [6] Ann. de l'Inst. Pasteur **37**, 711, 1923. — [7] Centralbl. f. Bakt. II, **81**, 28, 1930.

aber in mancher Hinsicht den im folgenden besprochenen Formen ähnlich verhalten. Ferner versuchte *Tetrault*, allerdings vergeblich, Einzellkulturen dieses Cellulosezersetzers herzustellen: von den 114 mit dem Mikromanipulator isolierten Zellen sind nur vier angewachsen; diese hatten aber — obgleich dieselben Formen auftraten — nicht mehr die Fähigkeit, die Cellulose anzugreifen. Es ist noch eine Reihe weiterer Arbeiten über thermophile Cellulosezersetzer erschienen, von denen aber hier keine ein unmittelbares Interesse hat.

Clausen[1] züchtet aus verschiedenen Substraten mehrere einander ähnliche Cellulosezersetzer, die zum Teil mit den von *Omeliansky* beschriebenen Formen übereinstimmen. Eigentümlich ist ihnen allen die Färbbarkeit mit Jod, welches rotbraune oder weinrote Töne hervorruft. Die Sporen sind sehr hitzebeständig (90 Minuten auf 100° C), das Temperaturoptimum liegt bei 37 bis 42° C, das Maximum bei 50° C. Junge Formen sind beweglich, die Beweglichkeit hört auf mit Beginn der Sporenbildung. Die Züchtung auf cellulosefreien Nährböden gelingt. Eine intensivere Lebenstätigkeit wird erzielt, wenn der Cellulosezersetzer mit *B. putrificus verr.* synthetisiert wird.

Es ist wenig wahrscheinlich, daß die beschriebenen Formen voneinander wesensverschieden sind; sondern es liegt vielmehr nahe, vor allem, wenn man die zuweilen außerordentlich geringen Abmessungen der Bakterien in Betracht zieht [z. B. ist der „Cellulosebazillus I" 0,1 μ (!)[2] bis 0,3 μ breit], daß es sich da um die Altersformen ein und desselben Bakteriums handelt. Dies ist besonders dann leicht möglich, wenn die Kultur uneinheitlich wächst, d. h. wenn verschiedene Altersformen (vgl. S. 209) gleichzeitig in der Kultur vertreten sind. Das beigegebene photographische Material spricht jedenfalls nicht dagegen.

In der gleichen Abhandlung beschreibt *Clausen* ein cellulosezersetzendes Clostridium, *Amylobacter navicula*. Man konnte dabei an die weiter unten beschriebenen Jugendformen unseres Cellulosezersetzers denken, wenn jenem nicht die Fähigkeit zur Bindung elementaren Stickstoffs[3] zukäme, und wenn es nicht die für *Amylobacter* charakteristische Jogenreaktion gäbe. Immerhin erscheint dieses *Clostridium* noch einigermaßen problematisch, da es sehr verbreitet sein soll und trotzdem nur selten gefunden wurde.

Eine etwa gleichzeitig erschienene Abhandlung von *Cowles* und *Rettger*[4] befaßt sich eingehender mit den physiologischen Eigenschaften der Cellulosezersetzer. Angereichert wird nach dem *Khouvine*schen Verfahren. Die Reinkultur gelingt auf Filterscheiben, die zwischen zwei Agarschichten liegen. Mit zunehmender Reinheit der Kultur wird das Wachstum schlechter; bewegliche Formen werden nicht angetroffen; die Stäbchen werden zuweilen zu zweien, niemals aber in Ketten zusammenhängend beobachtet. Bei Synthese mit *B. aerogenes* ist das Wachstum besser. Eingehend wird das Verhalten zu verschiedenen Kohlenhydraten und verwandten Stoffen

---

[1] Centralbl. f. Bakt. II, 84, 20, 1931. — [2] Mit der besten Optik würde bei subjektiver Mikroskopie ein gegen λ sehr dünner Streifen im Objektraum mindestens 0,2 bis 0,3 μ dick erscheinen; *Clausen* sagt nicht, ob er die angegebene Dicke aus der Bildhelligkeit abgeschätzt hat. — [3] *Rippel* (Fortschr. d. Bot. 1, 180, 1932) hat bereits darauf hingewiesen, daß die Angabe *Clausens*, es seien etwa 700 mg Stickstoff je 1 g Kohlenstoffquelle gebunden, auf einem methodischen Fehler beruhen muß. — [4] J. of Bact. 21, 67, 1931.

untersucht: außer Cellulose werden noch Arabinose[1], Xylose[1], lösliche Stärke[1] und Dextrin in nennenswertem Maße verwertet. Lactose und Glycerin hemmen die Cellulosegärung.

Werner[2] züchtete aus dem Darm der Rosenkäferlarve einen dort symbiontisch lebenden Cellulosezersetzer, der mit dem von *Khouvine* beschriebenen Organismus große Ähnlichkeit hat; auch dieser wurde ja im Darm von Säugetieren und des Menschen gefunden. Das Temperaturoptimum liegt bei 33 bis 37° C, das Maximum bei 39°. Die Symbiose mit der Larve scheint nicht besonders eng zu sein, da *Werner* das Bakterium auch außerhalb der Larve, z. B. in dem Ameisenhaufen, in dem die Larve lebt, und auch sogar in solchen, in denen sie nicht vorkommt, fand. Er hält das Bakterium deswegen von dem *Khouvine*schen für verschieden, weil das Vermögen zur Farbstoffbildung fehlt, und weil Unterschiede in der Beweglichkeit und in bezug auf das Temperaturoptimum bestehen. Wir werden später sehen, daß es sehr zweifelhaft sein kann, ob geringe Unterschiede in derartigen Merkmalen ausreichen, eine „Art"-Unterscheidung bei diesen Bakterien zu rechtfertigen.

Arbeiten mehr zusammenfassenden Inhalts sind viele in der amerikanischen Literatur, insbesondere aus der Feder *Waksmans*[3], erschienen; sie betonen meist die unmittelbare Bedeutung der Cellulosezersetzung für die Bodenforschung.

Zusammenfassend läßt sich über die Literatur der unter niedriger Sauerstoffspannung stattfindenden Cellulosezersetzung sagen, daß man die Eigenschaften der Erreger noch keineswegs einheitlich angegeben findet; übereinstimmend sind bei den meisten Forschern lediglich die diesen Bakterien eigentümliche Trommelschlegelgestalt zur Zeit der Sporenbildung und die große Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen Hitze. Die voneinander abweichenden Angaben der Eigenschaften lassen sich, wie wir im folgenden sehen werden, sicher zum Teil durch eine große Schwankungsfähigkeit dieser Eigenschaften erklären.

Methoden und Hilfsmittel.

Die nach *Omeliansky* aus den Substraten herausgezüchteten Cellulosezersetzer wurden für die Fortzüchtung in erster Linie in einer Nährlösung gehalten, die neben Mineralstoffen Cellulose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt. Daneben wurde noch Erdextrakt zugesetzt, obwohl Vergleichsversuche ergeben hatten, daß dieser Zusatz keinen merkbaren Einfluß auf das Wachstum dieser Bakterien hat; es sollte damit nur Vorsorge getroffen werden, daß alle der Nährlösung nicht unmittelbar zugesetzten Stoffe (Schwermetalle) den Bakterien in einer der gewohnten möglichst nahekommenden Zusammenstellung zugänglich seien.

[1] Diese Stoffe sind nach *Khouvine* und *Werner* nicht angreifbar, ebensowenig andere Kohlenhydrate, wie schon *Omeliansky* von seinen Cellulosezersetzern feststellte. — [2] Centralbl. f. Bakt. II, 67, 297, 1926. — [3] Z. B. diese Zeitschr. 2, 136, 1931.

Die Zusammensetzung der Nährlösung war folgende[1]:

Wasser dest.	900 ccm
Erdextrakt	100 „
Kaliumphosphat, sek., pro anal. *Merck*	1,0 g
Ammoniumphosphat pro anal. *Merck*	1,0 g
Magnesiumchlorid pro anal. *Merck*	0,5 g
Calciumcarbonat	3,0 g
Filtrierpapier in Streifen	2,0 g

Der Erdextrakt wurde erhalten durch Verrühren gleicher Teile lufttrockener, fruchtbarer Ackererde und Wasser, unter Zusatz von soviel Sodalauge, daß rotes Lackmuspapier deutlich gebläut wurde. Dieses Gemisch wurde $^{1}/_{2}$ Stunde im Autoklaven bei 130° C gehalten und dann abgenutscht. Beim Ansetzen der Nährlösung wurde zunächst das Magnesiumsalz für sich gelost und erst kurz vor dem Einfüllen in die Kulturgefäße mit der Lösung der anderen Stoffe vereinigt, damit die geringe Menge des langsam ausfallenden Ammonium-Magnesiumphosphats auf alle Gefäße gleichmäßig verteilt wurde. Nach Zugabe des Calciumcarbonats und der Cellulose zu den etwas über 250 ccm fassenden Rollflaschen wurden diese zwecks Sterilisation $^{1}/_{2}$ Stunde bei 120° im Autoklaven erhitzt.

Die Abimpfungen erfolgten im allgemeinen möglichst bald nach Beginn der Garung unter Benutzung des *Khouvine*schen Waschverfahrens; es wurden zu dem Zwecke etwa 0,5 bis 1 g der feuchten angegriffenen Cellulose viermal hintereinander in Reagensgläsern mit sterilem Wasser gewaschen, in der letzten Wäsche $^{1}/_{4}$ Stunde lang auf 75° C gehalten und nach rascher Abkühlung dem neuen Kulturgefäß eingeimpft. Die enghalsigen Gefäße trugen einen Gärverschluß mit Wasserabsperrung. Anfänglich wurden die Gefaße bis zum Gummistopfen mit Nahrlösung angefüllt, bei den spateren Weiterimpfungen wurden aus noch zu erwähnenden Gründen etwa 30 ccm Luft über der Nahrlosung belassen.

Es wurden mehrfach Isolierungen aus Acker- und Komposterde von dem Versuchsfeld des Instituts und von einem sauren und einem alkalischen Boden des Hilses bei Einbeck, aus dem Forstamtsbezirk Wenzen[2], vorgenommen. Wegen des – abgesehen von der Farbstoffbildung – sehr ähnlichen Verhaltens der verschiedenen Isolierungen wurden eingehendere Untersuchungen nur mit zwei „Stämmen" angestellt, die beide aus der Ackererde des Instituts gewonnen waren; diese seien im folgenden mit „B-Kultur" und „E-Kultur" bezeichnet. Die B-Kultur wurde anfangs mit unerhitztem Impfmaterial geführt, und diese später noch einige Zeit neben der mit erhitztem Material beibehalten; da sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden zeigten, wurde dann nur die erhitzte Kultur weitergeführt. Eine Zeit-

[1] In früheren, nicht veröffentlichten Versuchen von *Rippel* als günstig ermittelt. — [2] Für die Überlassung der beiden Proben bin ich Herrn Forstmeister *Volger*-Wenzen zu Dank verpflichtet. Es handelt sich um Fichtenauflagehumus, der in einem Falle unbehandelt, im anderen gemergelt war. Beide Proben riefen Cellulosegärung hervor, der saure Boden aber mit erheblicher Verzögerung.

lang wurde noch eine „A-Kultur“ beobachtet, bei der der oben genannten Nährlösung noch, in Anlehnung an *Omeliansky*, je Kulturgefäß 1 g Calciumsulfat zugesetzt war. Die Kultur war den anderen bis auf die fehlende Farbstoffbildung ähnlich. Es ist inzwischen nachgewiesen, daß die Reduktion des Sulfates durch einen Begleitorganismus verursacht wird[1], der für die Cellulosegärung unmittelbar keine Bedeutung hat. Es sei noch die bemerkenswerte wiederholte Beobachtung hinzugefügt, daß eine öfters übergeimpfte sulfathaltige Kultur, die gut Cellulose zersetzte (A-Reihe), bei Überimpfung in sulfatfreie Nährlösung keine Entwicklung zeigte.

Neben dem erwähnten flüssigen Substrat wurden noch einige feste Nährböden benutzt, die dazu dienen sollten, möglichst schnell zu einer Reinkultur des Cellulosezersetzers zu gelangen; es zeigte sich aber, daß das *Khouvine*sche Waschverfahren in Verbindung mit dem Erhitzen des Impfmaterials das sicherste und schnellste Verfahren zur Reinzüchtung der sporenbildenden Cellulosezersetzer ist, um so mehr, als die Sporen besonders hitzebeständig sind. So wurde z. B. noch versucht, die Bakterien in einer Wasserstoffatmosphäre auf Cellulosebrei, der mit der oben erwähnten Nährlösung getränkt und mit Calciumcarbonat vermengt ist, oder auf Filterscheiben, die auf Glasperlen mit der gleichen Nährlösung lagen und mit Calciumcarbonat bestreut waren, zu ziehen. Dies bereitete nicht die geringsten Schwierigkeiten, wenn man diese Nährböden mit einer Aufschwemmung befallener Cellulose beimpfte. Die örtliche Trennung der Keime, die das Wesen des *Koch*schen Verfahrens ausmacht, scheint hier aber nicht gewährleistet. Cellulose-Gipsplatten und aus Schwefelsäure gefällte Cellulose erwiesen sich als nicht besonders geeignet.

Außer diesen Nährböden wurden noch Fleischwasser, Fleischwassergelatine und -agar und Glucoseagar[2] verwendet; ferner wurde in der oben genannten Nährlösung die Cellulose durch Glucose oder Kartoffelstärke ersetzt; schließlich wurde noch die Cellulose-Mineralnährlösung mit Fleischwasserzusatz benutzt.

Die Bebrütung erfolgte im allgemeinen im Brutzimmer oder im elektrisch geheizten Brutschrank bei 37° C. Die gasanalytischen Versuche wurden ausschließlich im elektrischen Brutschrank bei 37 ± 0,1° C ausgeführt, wobei sich die Gasauffanggerätschaften außerhalb des Brutschrankes befanden. Nur in Sonderversuchen (vgl. S. 198) wurde von diesen Daten abgewichen.

Es wurde noch der Versuch gemacht, mit Hilfe einer Mikropipette Einzellkulturen herzustellen. Aber trotz mehr als 30 Isolierungen mit dem Mikromanipulator sowohl in der B-Reihe wie in der E-Reihe, und sowohl in der gewöhnlichen mineralischen Nährlösung wie in Fleischwasser (vgl. S. 201) konnte in keinem Falle ein Anwachsen erzielt werden. Auch in der Literatur findet man bisher keine einzige Angabe,

[1] *Rubentschik* (Centralbl. f. Bakt. II, 78, 483, 1928); jedoch auch reine Kulturen zeigen noch schwache, aus Verunreinigungen des Calciumcarbonats herrührende Schwefelwasserstoffbildung. — [2] Pepton 1,2 %, *Liebig*s Fleischextrakt 0,8 %, Kochsalz 0,2 %, Glucose 1 % und Agar 1,6 %.

nach der eine Einzellkultur dieser Cellulosezersetzer eindeutig gelungen wäre (vgl. S. 187). In dem vorliegenden Falle konnten die einzelnen Zellen oft eine Woche und länger im Hängetropfen beobachtet werden, ohne daß eine Veränderung an ihnen eingetreten wäre. Auch das Eintragen von zwei oder drei Zellen in einen Hängetropfen war ohne Erfolg. Vermutlich sind diese Mißerfolge darauf zurückzuführen, daß die benutzten Nährlösungen nicht den optimalen Wachstumsbedingungen entsprechen, wofür ja auch das Auftreten abweichender Formen (vgl. S. 196) spricht; es könnte auch sein, daß diese Cellulosezersetzer sehr an eine symbiontische Lebensweise gewöhnt sind, was mit den Beobachtungen *Clausen*s[1], *Werner*s[1] und *Cowles-Rettger*s[1] im Einklang wäre.

Ein Teil der Hängetropfenpräparate wurde in gewöhnlicher Weise durch Auflegen eines Deckglases auf einen dem ebenen Tragglas aufgekitteten Ring von bestimmter Höhe (es wurde kein gewöhnlicher Hohlschliff benutzt, um einwandfreie Beleuchtung, besonders im Dunkelfeld, zu erzielen), ein anderer zur Erzielung eines niedrigen Sauerstoffdruckes nach dem Mikro-*Fortner*-Verfahren[2], hergestellt. Das Eintragen der Hängetropfenpräparate in eine Wasserstoffatmosphäre empfahl sich nicht, weil beim Auspumpen des Gefäßes die Tropfen schnell eintrockneten, besonders dann, wenn sie Cellulose enthielten.

Die beigegebenen Mikrophotogramme wurden hergestellt mit dem Apochromat 40 ×, Öffnungszahl 0,95, mit Korrektionsfassung, von *Zeiss*, in Verbindung mit dem Homal III von *Zeiss*. Es wurde ein Trockensystem in diesem Falle vorgezogen, weil immer eine größere Anzahl von Deckglaspräparaten gleichzeitig zu verarbeiten war, und weil es auf den Unterschied im Auflösungsvermögen nicht so sehr ankam. Die Vergrößerung wurde bei allen Aufnahmen auf etwa 700 : 1 gebracht. Beleuchtet wurde bei den Hellfeldaufnahmen mit dem aplanatischen Kondensor, Öffnungszahl 1,4, von *Zeiss* bei etwa ein Drittel der Öffnung des Objektivs, in allen Fällen mit zentraler Einstellung der Kondensor-Iris; Blenden und Lichtquelle befanden sich in der *A. Köhler*schen Anordnung. Als Dunkelfeldkondensor diente der Kardioidkondensor Minimalapertur 1,2, von *Zeiss*, in Verbindung mit der gleichen Lichtquelle, aber mit parallelen Strahlenbündeln. Die Lichtquelle war eine 5 Amp. Gleichstrombogenlampe mit Kollektorlinse; für die Hellfeldaufnahmen waren Mattscheiben von geeigneter Durchlässigkeit und ein Gelbfilter „*Lifa*" Orthocolor Nr. 2 zwischengeschaltet. Als Negativmaterial diente im allgemeinen „*Hauff*" Ortho-Licht 17° Sch., für die Zedernölpräparate (vgl. S. 207) „*Hauff*" Ultra 21° Sch.

Begleitorganismen.

Die beiden im folgenden beschriebenen Begleitorganismen wurden nicht planmäßig herausgezüchtet, sondern nur beiläufig erhalten.

Bei den Versuchen, den Cellulosezersetzer aus der B-Reihe, die mit unerhitztem Impfmaterial geführt wurde, auf Cellulosebrei zu

---

[1] Vgl. S. 187. Auch *Khouvine* erwähnt, daß mit zunehmender Reinheit der Kultur der Anteil der vergorenen Cellulose sinkt. — [2] *Wámoscher* u. *Vasarhelyi*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **123**, 250, 1931.

ziehen, trat neben dem Bakterium noch ein *Actinomyceten*-artiger Organismus auf, der ebenfalls die Cellulose sehr intensiv zersetzte. Er unterscheidet sich aber schon rein äußerlich von jenem durch die Bildung eines erdgrunen Farbstoffs und durch einen eigentümlichen erdartigen Geruch. Aus den spateren, mit erhitztem Impfmaterial weitergeführten Überimpfungen der B-Reihe konnte er nicht wieder erhalten werden, so daß er ziemlich wenig widerstandsfahig gegen Wärme sein muß.

Leider stellte er nach einigen Überimpfungen auf dem gleichen Nahrboden das Wachstum ein, so daß er nicht genauer untersucht werden konnte. Es konnte aber festgestellt werden, daß er auch, und



Abb. 1.
Cellulosezersetzender *Actinomycet*
Links hitzefixiert und mit Carbolfuchsin gefarbt, rechts naturliches Präparat

zwar noch uppiger als in Wasserstoff, bei der Sauerstoffspannung der Luft gedeiht; aber auch hier stellte er bald sein Wachstum ein In Wasserstoff bildet der *Actinomycet* auf Cellulosebrei sehr zarte, in ihrer Dicke nahe der Auflosungsgrenze liegende, einfach verzweigte Faden, deren Äste in kleinen Kugelchen (Sporen ?) enden, die sich ebenso wie die Faden mit gewöhnlichen Farbstoffen anfarben lassen (Abb. 1). Bei gewöhnlicher Sauerstoffspannung ist das Wachstum ahnlich, nur ist die Ausbildung der Faden kraftiger[1].

Die Auffindung dieses *Actinomyceten* war deswegen von Bedeutung, weil damit die Frage auftauchte, ob etwa dieser winzige, die Cellulosefaser eng umspinnende und sich damit der Aufmerksamkeit des Beob-

[1] Von den von *Krainsky* (Centralbl. f. Bakt. II, 41, 649, 1914) angegebenen cellulosezersetzenden *Actinomyceten* kame dieser vielleicht dem *Act. griseus* oder dem *Act. griseoflavus* am nachsten, jedoch sind diese nur schwache Cellulosezersetzer. Einen der Gestalt nach ahnlichen *Actinomyceten* beschreibt *Bredemann* (Centralbl. f. Bakt. II, 86, 479, 1932), der aber braun gefarbt ist und nur Buttersaure abbaut. Im übrigen findet man ahnliche *Actinomyceten* zuweilen auf Rostefasern, wenn man diese mit Methylenblau behandelt.

achters leicht entziehende Organismus in *allen* Fällen der eigentliche und *alleinige* Cellulosezersetzer ist, und ob etwa das von *Omeliansky* u. A. beschriebene Bakterium nur die Rolle eines Begleiters bei der Cellulosezersetzung spielt. Dagegen spricht aber seine geringe Hitzebeständigkeit, und vor allem die Möglichkeit, daß viele Generationen in Fleischwasser gewachsene Bakterien wieder mit Erfolg in die Cellulose-Minerallösung zurückgeimpft werden können (vgl. S. 201); wir können daher mit Sicherheit sagen, daß das Bakterium nicht auf die „Vorarbeit" des *Actinomyceten* angewiesen ist.



Abb. 2.
Azotobacter-ähnlicher Organismus Natürliches Präparat in Tusche Hellfeld.

Ferner wurde aus derselben B-Reihe noch ein Buttersäure bildender *Coccus* herausgezüchtet, der äußerlich *Azotobacter* ähnlich sieht, und auch wie dieser, einen Schleimhof hat (Abb. 2). Er wächst aber nur bei sehr niedriger Sauerstoffspannung. Für den Abbau der Cellulose scheint er keine Bedeutung zu haben.

Wachstum des Cellulosezersetzers in der Cellulose-Mineralnährlösung.

Die aus den verschiedenen Erdproben herausgezüchteten cellulosezersetzenden Bakterien gleichen, in der angegebenen Nährlösung ge-





Abb 3
Normale Form des cellulosezersetzenden Bakteriums natürliches Präparat, links bei Dunkelfeld-, rechts bei Hellfeldbeleuchtung.

zogen, zur Zeit ihrer ausgeprägtesten Entwicklung im wesentlichen den Formen, wie sie *Omeliansky* und die meisten anderen Autoren als die Erreger der Cellulosegärung beschreiben. Auch die als thermophile

Cellulosezersetzer beschriebenen Formen reihen sich hier ein. Die Abb. 3 und 4 (linke Bildhälfte) zeigen diese Formen unter verschiedenen Präparationsbedingungen; diese Form sei weiterhin die normale Form genannt. In Abb. 3 (links) sieht man die äußere Kontur des Bakteriums, die in diesem Stadium stets bei Dunkelfeldbeleuchtung auftritt. Abb. 3 (rechts) zeigt dasselbe bei Hellfeldbeleuchtung; an diesem Bilde sieht man auch, wie dicht unter Umständen eine Faser besetzt sein kann ferner, daß das sporentragende Ende stets der Faser abgewandt ist. Die sporenlosen Stäbchen sind oft lebhaft beweglich, die sporentragenden sehr selten. Die Vergärung der Cellulose geht unter geringer Gasentwicklung und gewöhnlich auch unter Bildung eines gelben bis orange-



Abb. 4
Links normale Form des Cellulosezersetzers hitzefixiert und mit Carbolfuchsin gefärbt, rechts. *Amylobacter*, Trommelschlegelform, behandelt mit Jod

gelben Farbstoffes vor sich. Abb. 4 (links) zeigt das hitzefixierte und mit Carbolfuchsin gefärbte Präparat, man sieht die bereits von *Khouvine* angegebene granulierte Anfärbung der Stäbchen, die reifen Sporen färben sich nur nach vorheriger Beizung Die normale Form der Cellulosezersetzer wurde auch auf den Platten aus Cellulosebrei oder auf den Filterscheiben erhalten. Der dabei auftretende Farbstoff war zwar etwas heller, aber reiner und satter als in den Flüssigkeitskulturen

In der Literatur sind die Angaben über Form, Ausbildung und Größe der Spore ziemlich schwankend, gern werden sie zur Unterscheidung verschiedener „Arten" benutzt. Nach meinen Erfahrungen sind diese Eigenschaften aber im Verlauf der Fortzüchtung, selbst innerhalb einer Reihe, derart unstet, daß sie irgendwie als Unterscheidungsmerkmale kaum zu verwerten sein dürften. So scheint es z. B. auch nicht angängig, daß man nach den von *Omeliansky* gegebenen Abbildungen zwei verschiedene Typen der Cellulosezersetzer unterscheidet, ganz davon abgesehen, daß in diesem Falle auch noch andere Gründe dagegen

sprechen (vgl. S. 186 und 214). Geringe Schwankungen in der Sporenform und -größe kommen sogar in ein und derselben ausgeglichensten Kultur vor, wie Abb. 3 (links) andeutet.

Weniger Angaben findet man in der Literatur uber die Jugend- und Altersformen der Cellulosezersetzer Die Beobachtung der Jugendformen gelingt außerordentlich selten. Obgleich ich sehr viele Kulturen vor Beginn der Gärung oder Farbstoffbildung mikroskopisch kontrolliert habe, ist es mir doch nur in wenigen Fallen gelungen, die oft lebhaft beweglichen Jugendformen, die meist Spindelgestalt haben, zu erfassen. Meistens findet man noch Sporen von dem Impfmaterial, die aber durchweg von einem schwach lichtbrechenden Hof umgeben erscheinen, und die sich augenscheinlich im Zustande der „Keimung" befinden. Das Austreten eines Keimschlauches habe ich allerdings nie beobachtet; wahrscheinlich findet auch uberhaupt nur eine Verquellung der außeren Sporenpartien und eine Streckung der inneren Teile statt[1]. Die sich entwickelnden Formen sind zunachst *Amylobacter* nicht ganz unahnlich, zuweilen erscheinen sie etwas schraubig verbogen. Gelegentlich findet man dann einzelne Cellulosefasern, an denen sich die Spindeln anzusetzen beginnen (Abb. 5). Nach der Anheftung strecken sich die Spindeln, so daß man zu einem bestimmten Zeitpunkte alle moglichen Übergange zwischen der Spindelform (Abb. 6, rechts *b*) und der Stabchen- bzw. Trommelschlegelform (Abb. 6, rechts *a*) findet; es wird aber auch schon die Ausbildung abweichender Formen angedeutet (Abb. 6, links in Pfeilrichtung). Die Zeitspanne, in der die Jugend- und Übergangsformen auftreten, muß außerordentlich kurz sein; es kann sich, nach der Seltenheit ihrer Auffindung, nur um wenige Stunden handeln.



Abb. 5
Jugendformen des Cellulosezersetzers, sich an eine Cellulosefaser anheftend, naturliches Präparat.

Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß andererseits auch *Amylobacter* — wenn nicht gerade haufig — so doch zuweilen

[1] Dafür spricht z. B., daß die inneren Teile der jungen Formen starker Farbstoff aufnehmen als die peripheren Teile, wie aus Abb. 6 hervorgeht.

die gestreckte Form des Trommelschlegels annehmen kann[1] (Abb. 4, rechts) und dann dem Cellulosezersetzer äußerlich ähnlich wird. Ob dadurch irgendwelche „verwandtschaftlichen" Beziehungen zum Ausdruck kommen, mag dahingestellt bleiben; immerhin ist beachtenswert, daß neben physiologischen Ähnlichkeiten auch solche der Gestalt bestehen.

Neben diesen normalen Formen findet man aber, sowohl in der Cellulose-Mineralnährlösung, wie auf Cellulosebrei und Filterscheiben in Wasserstoff, Formen, die mehr oder weniger von diesen abweichen. Am haufigsten findet man — wohl in jeder Kultur — fadige Ab-



Abb. 6
Übergangsformen des Cellulosezersetzers, lufttrocken mit verdünntem Carbolfuchsin gefärbt.

weichungen, und die Übergange zu den normalen Formen sind meist reichlich anzutreffen. Bei den kurzeren „Faden" kommt es meistens noch zur Sporenbildung, wie aus Abb. 7 ersichtlich ist, oft bestehen diese Faden aus zwei, selten aus mehreren Stucken. In einzelnen Fallen werden diese Faden recht lang; so zeigen Abb. 16 (Mitte) und Abb. 20 langere Faden und Abb. 8 ein ganzes „Nest" eines Fadengewirres, diese Faden scheinen die Fahigkeit zur Sporenbildung eingebußt zu haben. Sie erscheinen zuweilen, wie auch sogar normale Formen, verzweigt; dies ist aber entweder bei fixierten Präparaten durch zufallige Anordnung beim Antrocknen oder im naturlichen Praparat, wie Abb. 9 zeigt, dadurch zustandegekommen, daß noch mehrere Faden oder Stabchen einem kleinen Stuckchen einer Cellulosefaser anhaften; diese kann dann man dann oft im polarisierten Lichte nachweisen. Echte Verzweigungen treten bei diesen Formen nicht auf.

In der Regel pflegt an einem Ende des Stabchens, an dem sich spater die Spore ausbildet, eine Anschwellung zu entstehen (Trommel-

[1] Vgl. *N. Svartz*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **125**, 115, 1932.

schlegelform), die sich dadurch von der fertigen Spore unterscheidet, daß sie auch ohne Beizung die gewöhnlichen Farbstoffe annimmt. Oft aber bilden sich solche Anschwellungen in oder nahe der Mitte des Stäbchens; es kommt dann freilich nicht mehr immer zur Sporenbildung oder wenigstens nicht an der Stelle der Anschwellung. Solche abweichenden Formen sehen wir in den Abb. 7 und 10. Abb. 7 (oben,

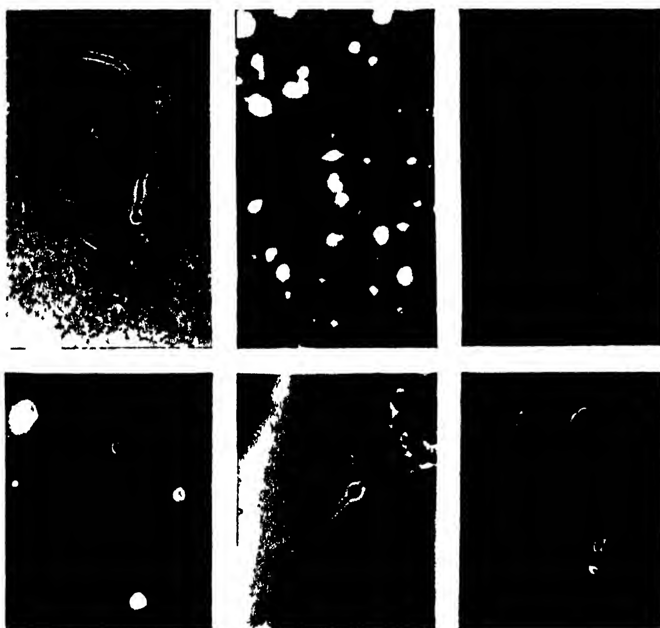


Abb 7
Abweichende Formen. Natürliche Präparate. Oben: Anschwellung und Spore an verschiedenen Stellen, Citronenform, Faden. Unten: Faden über die Spore hinaus fortgesetzt. Oben Mitte und unten links und rechts Dunkelfeld, anderes Hellfeld

links) zeigt, daß trotz der mittleren Anschwellung noch eine endständige Spore ausgebildet wurde; in der unteren Reihe dieser Abbildung finden sich Formen, bei denen die Anschwellung sehr nahe an einem Ende sitzt, so daß sich das Stäbchen scheinbar noch über die Spore hinaus fortsetzt. Bei den Formen der Abb. 7 (oben, Mitte) und Abb. 10 ist die Anschwellung weitergetrieben, so daß die Bakterien zum Teil Citronengestalt angenommen haben. Es ist in diesem Zusammenhang interessant, daß auch *Tetrault*[1] in seinen Kulturen thermophiler Cellulosezersetzer gerade dieselben abweichenden Formen gefunden und genau beschrieben hat.

[1] Centralbl. f. Bakt. II, 81, 28, 1930. Irgendwelche Inhaltskörper, wie sie *Tetrault* angibt, wurden hier in den Anschwellungen nicht gefunden.

Wodurch die Ausbildung dieser Formen verursacht wird, ist nicht ersichtlich, man muß schon annehmen, daß die benutzte Cellulose-Mineralnährlösung den Ansprüchen der Cellulosezersetzer nur mangelhaft genügt; hierfür spricht auch der Mißerfolg mit den Einzellkulturen. Künstlich konnten solche abweichenden Formen niemals dauernd hervorgerufen werden, weder durch Zusatz von Reizstoffen zur Nährlösung noch durch Bebrüten bei einer anderen Temperatur. Andere Formen wie die beschriebenen wurden in der Cellulose-Mineralnährlösung nicht beobachtet.



Abb. 8
„Nest" eines Fadengewirres. Natürliches Präparat, Hellfeld.

Es wurde weiter untersucht, welchen Einfluß eine Veränderung der Temperatur während der Bebrütung auf das Wachstum ausübt. Die günstigste Temperatur liegt bei 35 bis 45° C. Bei niederer Temperatur tritt nur eine Verzögerung des Gärungsbeginns, aber keine sonstige Änderung ein; bei Temperaturen, die sich 55° C nähern, tritt ebenfalls eine Verzögerung ein, aber es geht damit auch die Fähigkeit zur Farbstoffbildung zurück. Bei 60° C tritt selbst nach langer Zeit kein Wachstum mehr ein.



Abb 9.
Scheinbar verzweigte Cellulosezersetzer. Natürliches Präparat, Hellfeld.

Es drängt sich hiermit die Frage auf, ob trotz dieses letzten Ergebnisses die von *Tetrault* und anderen untersuchten thermophilen Cellulosezersetzer, deren Temperaturoptimum ja noch oberhalb des Temperaturmaximums des hier beschriebenen Cellulosezersetzers liegt, von diesem *wesensverschieden* sind, oder ob jene nur durch langsame „Anpassung" an höhere Temperaturen gewöhnt sind. Man könnte sich ja vorstellen, daß sie in den oberen Bodenschichten, in denen bei praller Sonneneinstrahlung in einzelnen an der Oberfläche liegenden Partikelchen wohl Temperaturen von der in Frage kommenden Höhe erreicht werden mögen, dazu Gelegenheit fanden. Auffallend ist jedenfalls die weitgehende Übereinstimmung beider Formengruppen

nicht nur in physiologischer[1], sondern vor allem in morphologischer Hinsicht, die sogar soweit geht, daß selbst die abweichenden Formen die gleichen sind. Ich möchte aus diesem Grunde, und bevor wir nicht eindeutige Kriterien für die Artabgrenzung bei den Bakterien haben, mich für die zweite Auffassung entscheiden.

Das sporenhaltige Impfmaterial wurde im allgemeinen $^1/_4$ Stunde lang auf 75° C während der letzten Wäsche erhitzt. Ebenso langes Erhitzen auf 80 und 90° C hatte keinen Einfluß auf den Verlauf des Wachstums; $^1/_4$stündiges Erhitzen auf 100° C verzögerte den Wachstumsbeginn um einige Zeit; in der Kultur trat vorübergehend eine Erhöhung des Anteiles der abweichenden Formen ein, der aber in den unter gleichen Bedingungen



Abb. 10
Abweichende Formen mit mittlerer Anschwellung Mitte ausgeprägte Citronenform. Natürliche Präparate Hellfeld

einige Zeit fortgeführten Weiterimpfungen wieder zurückging $^1/_2$stündiges Erhitzen des Impfmaterials auf 100° C verzögerte den Beginn der Gärung auf etwa 1 Monat gegenüber 5 bis 8 Tagen der wie gewöhnlich behandelten Weiterimpfung. Die Sporen von *Amylobacter* ertragen nach *Bredemann*[2] 5 Minuten langes Erhitzen auf 100° C nicht mehr.

Das Verhalten des hier untersuchten Cellulosezersetzers gegenüber Sauerstoff ist bemerkenswert und weicht von dem z. B. von *Khouvine* angegebenen Verhalten ihres Organismus erheblich ab. Es wurde nämlich beobachtet, daß die Sperrflüssigkeit vor Beginn der Gärung in das Sperrohr zurücksteigt. Das Ergebnis der Gasanalyse (vgl. S. 218) zeigt, daß hierbei fast der ganze Sauerstoff verbraucht wurde. Um nun qualitativ festzustellen, ob eine günstigste Sauerstoffspannung

[1] *Pringsheim* (Centralbl. f. Bakt. II, 38, 513, 1913) findet allerdings, daß bei den thermophilen Cellulosezersetzern, im Gegensatz zu den mesophilen, Buttersäure nicht entsteht. — [2] Centralbl. f. Bakt. II, 23, 385, 1909.

für das Wachstum dieses Cellulosezersetzers besteht, wurden fünf von den beschriebenen Versuchsgefäßen mit Cellulose-Mineralnährlösung gefüllt, derart, daß in dem einen Gefäß die Nährlösung bis zum Verschluß reichte, in dem zweiten 10 ccm, in dem dritten 20 ccm, in dem vierten 40 ccm und in dem fünften 60 ccm Luft über der Flüssigkeit blieben. Die Gärung begann zuerst im vierten Gefäß und in den anderen Gefäßen um so später, je mehr die überstehende Luftmenge von der im vierten Gefäß nach oben oder unten abwich. Mit der Zeit glichen sich die Unterschiede mehr oder weniger aus. Je mehr Luft über der Nährflüssigkeit stand, desto stärker war die über der Cellulose stehende Flüssigkeit getrübt. Die Farbstoffbildung war am ausgeprägtesten ebenfalls im vierten Gefäß (vgl. S. 204), am wenigsten in dem ersten und fünften Versuchsgefäß. Bei der Sauerstoffspannung der Luft gediehen diese Cellulosezersetzer in der Cellulose-Mineralnährlösung nicht mehr.

Wachstum auf anderen Nährstoffen.

Nachdem man festgestellt hatte, daß manche Stoffe, wie z. B. Magnesiumsulfat, bei *Bakterien* und *Actinomyceten* Anschwellungen, „Involutionsformen", hervorrufen[1], lag es nahe, durch Zusatz solcher Stoffe zur Cellulose-Minerallösung die oben beschriebenen abweichenden Formen künstlich zu erzeugen. Zu diesem Zwecke wurden Zusätze von Magnesiumsulfat in Mengen von 1, 2 und 5% zur Nährlösung gemacht.

Bei den beiden geringen Magnesiumsulfatgaben trat eine schwache Verzögerung im Anwachsen ein, und die Filtrierpapierstreifen wurden mehr in einzelnen Punkten als gleichmäßig angegriffen; dies ist allerdings keine Besonderheit, da ein solches Anwachsen auch bei unbehandelten Kulturen zuweilen beobachtet wurde[2]. Sonst verlief die Gärung aber regelmäßig, und nach einiger Zeit war die Cellulose bis auf einen geringen Rest zerfallen. Das mikroskopische Bild der Kulturen war normal. Bei dem hohen Magnesiumsulfatzusatz war die Verzögerung erheblicher. und während der Wachstumszeit wurde nur ein Teil der Filterstreifen angegriffen, während der Rest selbst nach sehr langem Stehen der Kultur unversehrt zurückblieb. Das mikroskopische Bild war nicht das erwartete; das Wachstum war zwar sehr uneinheitlich, neben wenigen jüngeren fand man sehr viele alternde Formen (vgl. S. 209) und ferner reife Sporen, aber die abweichenden Formen, insbesondere die Anschwellungen, waren kaum häufiger als in den normalen Kulturen. Auffallend waren nur einige fädige Formen, die, im Gegensatz zu den

[1] *Stapp* u. *Zycha*, diese Zeitschr. 2, 493, 1931; *Pietschmann* u. *Rippel*, ebenda 3, 422, 1932. — [2] Dieses wurde auch von *Omeliansky* und *Khouvine* angegeben.

sonst beobachteten Fäden, unregelmäßige bauchige Anschwellungen zeigten (Abb. 11).

Setzt man zu der Mineralnährlösung anstatt der Cellulose Glykose oder Kartoffelstärke, so tritt keine Gärung ein; ebensowenig hat ein Zusatz von Glykose zu der Cellulose-Minerallösung einen beschleunigenden oder verzögernden Einfluß auf den Ablauf der Gärung. Auch der Zusatz von nicht mehr als etwa 10 % Fleischwasser zu dieser Nährlösung bringt keine Änderung.

Impft man einen im Zerfall befindlichen Filterstreifen in reines Fleischwasser, so sieht man nach einiger Zeit eine Trübung eintreten, die sich aber an der Oberfläche hält und hier schließlich ein lockeres Häutchen bildet. Im mikroskopischen Bilde erscheinen dann zunächst lebhaft bewegliche, spindelförmige Stäbchen, die nach einiger Zeit an einem Ende eine Spore ausbilden. Zuweilen zeigen sie deutlich sichtbare Inhaltskörper, besonders die älteren Formen. Diese Spindelformen treten bei hoher wie bei niedriger Sauerstoffspannung auf.



Abb. 11.
Geschwollener Faden in Cellulose-Minerallösung mit 5 % Magnesiumsulfatzusatz. Natürliches Präparat; Dunkelfeld.

Da in dem Versuch von einer vermutlich reinen Kultur (B_{28}) des Cellulosezersetzers ausgegangen wurde, und da auch das mikroskopische Bild der Fleischwasserkultur den Eindruck einer Reinkultur machte, lag es nahe, anzunehmen, daß es sich auch hier um den Cellulosezersetzer selbst handelte. Der Beweis hierfur wurde dadurch erbracht, daß aus einer langen Reihe von Weiterimpfungen in Fleischwasser wieder in die Cellulose-Minerallösung mit Erfolg zurückgeimpft werden konnte. Der Minerallösung war in einem Falle kein Zusatz, im anderen Falle ein Zusatz von 10 % Fleischwasser gemacht worden; in diese Lösungen wurden 5 ccm einmal von der 18. Überimpfung, ein weiteres Mal von der 33. Überimpfung der Fleischwasserkultur hineingeimpft. In allen Fällen wuchsen die Kulturen an; und zwar aus der 18. Überimpfung zuerst in der Lösung mit Fleischwasser, aus der 33. zuerst in der ohne Zusatz, woraus die Zufälligkeit des früheren Anwachsens in jedem Falle hervorgeht.

Gegen den Einwand, daß es sich hier doch um ein anderes Bakterium handele, und daß die Sporen des eigentlichen Cellulosezersetzers bei den Überimpfungen „mitgeschleppt“ seien, spricht seine außerordentlich geringe Wahrscheinlichkeit. Denn die benutzte Platinöse faßte etwa 5 cbmm,

das Röhrchen mit Fleischwasser etwa 10^4 cbmm Flüssigkeit; nimmt man nun an, daß der Inhalt der ersten Fleischwasserkultur fast ausschließlich aus Sporen des Cellulosezersetzers und nur einer Spur des hypothetischen in Fleischwasser gedeihenden Bakteriums bestehe, und daß jede Spore 1 μ^3 Rauminhalt hat, so würde — Unveränderlichkeit und völlige Zusammenhangslosigkeit der Sporen vorausgesetzt — in der 18. Weiterimpfung in Fleischwasser eine einzige Spore des Cellulosezersetzers nur noch mit der Wahrscheinlichkeit von weniger als $^1/_3 \cdot 10^{46}$ zu erwarten sein, in der 33. natürlich mit noch unendlich viel kleinerer Wahrscheinlichkeit, so daß praktisch die Möglichkeit einer Mitschleppung völlig ausgeschlossen ist. Ähnliche Betrachtungen gelten übrigens für das *Khouvine*sche Waschverfahren.

Merkwürdigerweise wurde Cellulose in reinem Fleischwasser niemals angegriffen, dagegen dicht von den Bakterien besetzt[1].

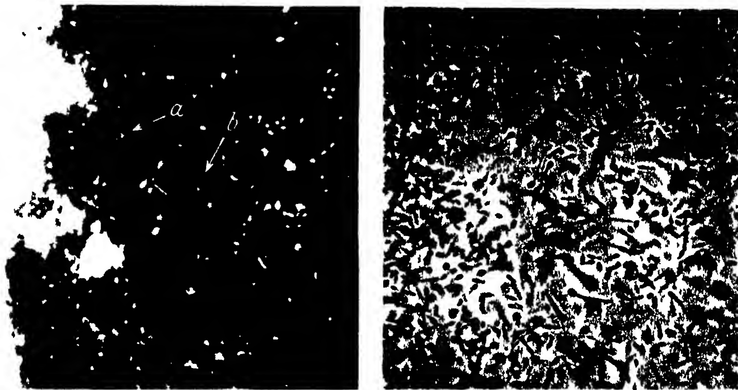


Abb 12.
Zerfallende Trommelschlegelform und entstehende Spindelformen in Fleischwasser. Natürliches Präparat; links Dunkelfeld, rechts der gleiche Bildausschnitt Hellfeld

Es wurde aber auch umgekehrt der Beweis erbracht, daß die normalen Formen des Cellulosezersetzers, wie man sie in der Cellulose-Minerallösung findet, in Fleischwasser nicht beständig sind und zerfallen, und daß ihre Sporen sich dann zu spindelförmigen Stäbchen entwickeln. Abb. 13 zeigt die in einzelne Stücke zerfallende normale Form, das Sporenende hat sich gerade vom Stäbchen abgetrennt. Die Ausbildung der Spindelform zeigt Abb. 12; im Dunkelfeldbild treten die zerfallenden normalen Formen, im Hellfeldbild besonders die Spindelformen hervor. Diese Bilder wurden dadurch erhalten, daß mit Hilfe des Mikromanipulators eine einzelne, stark von normalen Formen besetzte Cellulosefaser in einen Fleischwasserhängetropfen eingetragen

[1] *Cowles-Rettger* und *Werner* finden, daß Cellulose auch in Fleischwasser zerfällt; bei *Werner* wachsen die Cellulosezersetzer auf Fleischwasser oder Fleischwasseragar ohne Cellulosezusatz nicht.

wurde. Nach einigen Stunden Bebrütung wurde die Aufnahme am unfixierten, etwas angetrockneten Präparat gemacht. Auf festen Fleischwassernährboden bilden sich die gleichen Formen aus. Die Farbe dieser Kulturen ist schmutzigweiß, Gasbildung fehlt.

Ferner wurden noch Strich- und Stichkulturen in Dextroseagar untersucht. Im allgemeinen wurden ähnliche Formen erhalten wie in Fleischwasser, im Stichkanal war das Wachstum nur spärlich. Am Rande des Stichkanals wurden merkwürdigerweise Formen erhalten, wie sie Abb. 14 zeigt; links sieht man das hitzefixierte und mit Carbolfuchsin gefärbte, rechts das natürliche Präparat. Auffällig sind die neben den kleinen Stäbchen auftretenden Fäden dadurch, daß sie in der Nähe der Mitte eine klumpige Anschwellung tragen (Abb. 14, rechts, in Pfeilrichtung); diese Anschwellung fällt nach dem Hitzefixieren zusammen, ihre Stelle bleibt aber nach der Anfärbung durch eine größere Farbstoffanhäufung (Abb. 14, links in Pfeilrichtung) noch erkennbar. Es scheint demnach so, daß auf den letztgenannten Nährsubstraten, insbesondere auf Dextroseagar, im Gegensatz zur Cellulose-Mineralnährlösung bzw. den daraus abgeleiteten festen Nährboden, die Cellulosezersetzer nur bei der Sauerstoffspannung der Luft „normal“ gedeihen; dabei unterscheiden sich allerdings schon die „normalen“ Formen auf beiden



Abb. 13.
In Stücke zerfallende Trommelschlegelform, die in Fleischwasser eingetragen wurde. Natürliches Präparat. Dunkelfeld.





Abb. 14.
Abweichende Formen am Stichkanal in D-Agar. Links hitzefixiert und mit Carbolfuchsin gefärbt, rechts natürliches Präparat. Hellfeld.

Nährböden voneinander. Daß verschieden zusammengesetzte Nährsubstrate unter Umständen eine verschiedene optimale Sauerstoffspannung bedingen, darauf ist bereits von *Zycha*[1] hingewiesen worden.

Bei den D-Agarstichkulturen ist noch bemerkenswert, daß bei einer Abimpfung aus der E-Reihe etwa 2 mm unter der Agaroberfläche ein carminroter Farbstoffring auftrat, der bei Abimpfungen von *dieser* Kultur wieder erhalten wurde; dagegen trat er nicht wieder auf bei neuen Abimpfungen aus höheren Weiterimpfungen der E-Reihe. Es konnte daher nicht festgestellt werden, wieweit diese Farbstoffbildung mit der bei der Cellulosezersetzung auftretenden etwas zu tun hat.

Farbstoffbildung.

Die Cellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung ist nicht unter allen Umständen von einer Farbstoffbildung begleitet; so fehlte diese z. B. in einer nur wenige Überimpfungen geführten C-Kultur von *vornherein* vollständig, während es in einer anderen, D-Kultur, nur zu einer ganz schwachen Farbstoffbildung kam. In der Regel pflegt bei allen Kulturen die Farbstoffbildung nach Überschreitung einer gewissen, allerdings von Kultur zu Kultur wechselnden Anzahl von Weiterimpfungen abzuklingen. Welche äußeren Bedingungen für das Zustandekommen und den zeitlichen Verlauf der Farbstoffbildung maßgebend sind, konnte nicht ermittelt werden. Jedoch scheint das Bestehen einer gewissen, wenn auch geringen, Sauerstoffspannung erforderlich zu sein; denn es gelang niemals, den Farbstoff (zwecks Gewinnung einer größeren Menge) in großen Kulturgefäßen von etwa 4 bis 8 Liter Inhalt[2] in gleicher Intensität zu erhalten wie in den kleinen Gefäßen von $^1/_4$ Liter, obgleich nach längerer Zeit auch in jenen eine, wenn auch träge Gärung der Cellulose in Gang kam. Erst wenn der Gärverschluß des Gefäßes geöffnet war, trat in den oberen Schichten der am Boden lagernden Cellulose eine mäßige Gelbfärbung auf. Auch in den kleinen Kulturgefäßen war die Farbstoffbildung kräftiger, wenn von vornherein etwas Luft über der Nährflüssigkeit belassen wurde (vgl. S. 200).

Der Farbstoff ist *örtlich* an die Stäbchen und Trommelschlegel gebunden, und er tritt in der Kultur gleichzeitig mit dem Erscheinen dieser Formen auf. Den Farbstoff an diesen Formen unmittelbar mikroskopisch nachzuweisen, ist bei der absolut geringen Größe der einzelnen Bakterien und der damit verbundenen geringen Anhäufung des Farbstoffes außerordentlich schwer. Es gelingt dies aber, wenn man die genannten Formen mit etwa gleichgroßen Stäbchen eines anderen

---

[1] Diese Zeitschr. 3, 194, 1932. — [2] Diese enthielten ebenso, wie anfangs die kleinen Gefäße, keine Luft über der Nährlösung.

farblosen Bakteriums mischt (z. B. *B. mycoides*) und bei Dunkelfeldbeleuchtung mit hoher Öffnungszahl (n. Ap. > 1) betrachtet: es heben sich dann die Cellulosezersetzer durch Kontrastwirkung leuchtend goldgelb von den weiß erscheinenden anderen Stäbchen ab. Der Farbstoff muß sich auch wohl ausschließlich in den äußeren Teilen der Zelle befinden; denn bei den alternden Formen, in denen die Sporenbildung kurz vor der Vollendung steht, erscheint der allein übrig bleibende axiale Teil (vgl. S. 209) rein weiß; dies fällt besonders auf, wenn Formen verschiedenen Alterszustandes in der Kultur vertreten sind.

Der Farbstoff teilt sich in der Regel der Cellulosefaser mit, oft so stark, daß die einzelne Faser auch im mikroskopischen Bilde sattgelb erscheint. Der Farbstoff geht dann offenbar aus den peripheren Teilen der Zelle auf die Faser über.

Die in den jungen Kulturen auftretenden Spindeln scheinen wenig oder gar keinen Farbstoff zu besitzen; es ist wahrscheinlich, daß die Bildung des gelben Farbstoffes in dem Augenblick einsetzt, in dem die Cellulosefaser *selbst* angegriffen wird, so daß seine Entstehung wohl unmittelbar mit dem Abbau der Cellulose zusammenhängen muß. Denn in den Fleischwasser- und D-Agarkulturen erscheinen die Cellulosezersetzer schmutzig weiß bis grau, ohne gelben Ton oder Farbstoffbildung überhaupt, mit Ausnahme der einen, S. 204, erwähnten Abimpfung aus der E-Reihe in D-Agar.

Der gelbe Farbstoff läßt sich aus der Faser weder mit Wasser noch mit verdünnten Säuren oder Laugen, noch mit Ammoniak herauslösen; ebensowenig scheint dieser Farbstoff löslich zu sein in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln wie Alkohol, Äther, Benzol oder Xylol[1]. Zuweilen war allerdings bei ganz alten Kulturen die über dem Celluloserest stehende Flüssigkeit schwach gelblich gefärbt[2]. Die Gewinnung einer größeren Menge Farbstoff zwecks chemischer Untersuchung gelang daher nicht (vgl. auch S. 204). Der an die Faser gebundene Farbstoff schlägt bei der Behandlung mit verdünnten Säuren in ein Fleischrot um; bei der Behandlung mit verdünnten Alkalien verändert er die Farbe kaum oder wird höchstens etwas dunkler und schmutzig. Starke Säuren, die die Faser zerstören, zerstören mit ihr auch den Farbstoff.

[1] *Khouvine* findet in ihren Untersuchungen, daß der gelbe Farbstoff in Alkohol löslich ist; entweder handelt es sich um einen anderen Farbstoff oder aber, da Fäkalextrakt zur Nährlösung zugesetzt wurde, ist es nicht ganz ausgeschlossen, daß sich nicht der Farbstoff der Cellulosefaser, sondern etwa in die Nährlösung geratene Gallenfarbstoffe in Alkohol gelöst haben. — [2] Diese Färbung kann allerdings auch von dem Erdextrakt allein herrühren, da wegen der Auswechselung des Gärverschlusses durch einen Wattepfropfen bei den ausgegorenen Kulturen nach und nach etwas von der Nährlösung verdunstete.

Nicht nur die Fähigkeit zur Farbstoffbildung überhaupt, sondern auch der feinere Ton der Farbe wechselt von Kultur zu Kultur und bei derselben Kultur im Verlaufe der Wachstumszeit. So war z. B. in der E-Reihe wie in der B-Reihe zunächst nach der Isolierung aus Erde die Farbstoffbildung wenig ausgeprägt und der Ton schmutzig gelb; mit fortschreitender Reinheit der Kultur nahm dann die Tiefe und Sättigung der Farbe bis zu einem Höchstwert zu — im Verlauf der Weiterimpfungen allerdings schwankend —, bis sie nach einer verhältnismäßig hohen Zahl von Weiterimpfungen immer blasser wurde und schließlich ganz verschwand. Hiermit geht ein entsprechender Grad der Einheitlichkeit und Lebenskräftigkeit der Kultur einher. Die beiden Kulturen unterscheiden sich hinsichtlich dieses Ablaufes darin, daß er in der E-Reihe erheblich schneller erfolgte als in der B-Reihe: die Farbstoffbildung in der E-Reihe blieb bereits nach 20 Weiterimpfungen aus, in der B-Reihe erst nach 65. Dem entsprechen etwa $^3/_4$ Jahre in der E-Reihe gegenüber 2 Jahren in der B-Reihe. Zur Zeit der größten Sättigung war der Farbton in der E-Reihe ein tiefes Orange, in der B-Reihe ein mehr gelbliches Orange. Durch einen Unterschied in der Reaktion der Lösung kann dies nicht verursacht sein; denn die Lösung ist zu Beginn des Wachstums schwach alkalisch ($p_H = 8$), zum Schluß der Gärung, wie zu erwarten, neutral ($p_H = 7{,}1$), da Calciumcarbonat im Überschuß vorhanden war. Es ist vielmehr anzunehmen, daß der Farbstoff aus mehreren Komponenten besteht, die in den verschiedenen Kulturen bzw. in den verschiedenen Überimpfungen der einzelnen Reihe in verschiedenen Verhältnissen zugegen sind. Hierfür spricht auch noch die Beobachtung, daß zuweilen spontan ein anderer Farbstoff erscheint; so trat z. B. bei der E-Reihe in der 20. Überimpfung, als die normale Farbstoffbildung schon ziemlich erloschen war, nach Beendigung der Gärung plötzlich ein rosaroter Farbstoff auf. In der Abimpfung konnte er nicht wieder erhalten werden. Auffällig ist ferner, daß dieselbe E-Reihe, die im ganzen in ihrer Farbstoffbildung gegenüber der B-Reihe nach der roten Seite abwich, auch auf D-Agar in einem Falle roten Farbstoff gebildet hat (vgl. S. 204).

Innenstruktur und Inhaltskörper der normalen Formen.

Bei der Färbung der normalen Formen der Cellulosezersetzer mit Carbolfuchsin erhält man nicht, wie bei vielen anderen Bakterien, eine gleichmäßige Färbung des ganzen Bakteriums oder gar eine stärkere Anfärbung der Außenpartien (Membran), sondern man sieht, daß gewisse *innere* Teile, die ziemlich streng axial gelagert sind, vorzugsweise den Farbstoff aufzunehmen pflegen: die Achse erscheint granuliert gefärbt (Abb. 4, links), wie schon *Khouvine* festgestellt hat. Die peripheren Teile nehmen fast keinen Farbstoff auf, so daß die gefärbten Formen viel dünner erscheinen als bei gleicher Vergrößerung die im natürlichen Präparat befindlichen Formen bei Dunkelfeldbeleuchtung[1] (vgl. Abb. 4, links, mit Abb. 3, links). Noch deutlicher wird die Art

[1] Zum Vergleich können in diesem Falle natürlich *nur* die möglichst lichthoffreien Photogramme dienen, da wegen der Irradiation die Bakterien bei subjektiver Betrachtung im Dunkelfeld stets dicker erscheinen als im Hellfeld.

dieser Farbstoffaufnahme bei Verwendung von verdünnter Fuchsinlösung und Vitalfärbung, wobei die axial gelagerten Körnchen mehr getrennt erscheinen als bei Intensivfärbung (Abb. 15)[1]. Im natürlichen Präparat ist diese innere körnige Struktur bei Hellfeldbeleuchtung entweder gar nicht zu sehen, oder sie erscheint nur ganz schwach angedeutet; bei Dunkelfeldbeleuchtung tritt nur die äußere Begrenzung, „Membran", als leuchtende Kontur hervor. Aber wir sahen schon bei der Besprechung der in Fleischwasser eingetragenen normalen Formen, daß diese dabei alsbald in einzelne „Stücke" zu zerfallen beginnen; man muß daher annehmen, daß eine körnige Innenstruktur bereits in den normalen und unbeeinflußten Formen vorhanden ist.



Abb. 15.
Normale Form, mit verdünntem Carbolfuchsin vital gefärbt. Hellfeld.

Der direkte Nachweis dieser Annahme gelang mit Hilfe des Verfahrens von *Eisenberg*[2]. Hiernach wird das Objekt in ein Medium eingebettet, dessen Brechungsverhältnisse möglichst denen der peripheren Teile der Zelle gleichen, so daß die beleuchtenden Strahlen ungehindert bis zu den Inhaltskörpern vordringen können. Beleuchtet wird mit einem Dunkelfeldkondensor hoher Minimalapertur. Als geeignetes Einbettungsmedium erwies sich bei den Cellulosezersetzern das Immersionszedernöl $n_D = 1{,}515$ oder auch, zwecks bequemerer Umbettung, das dünnere Öl[3] $n_D = 1{,}503$. Abb. 16 zeigt in der linken Kolonne die Wasserpräparate, in der rechten den gleichen Bildausschnitt der Zedernölpräparate; man sieht, daß die peripheren Teile der Zelle so gut wie zum Verschwinden gebracht werden. Dabei zeigt sich, daß nicht nur die Trommelschlegelformen, sondern auch bereits die noch sporenfreien Stäbchen eine solche Innenstruktur besitzen, welche der bei Fuchsinfärbung erhaltenen zu entsprechen scheint.

Die in Abb. 16 wiedergegebenen Aufnahmen stammen von schwach fixiertem Material, um vergleichbare Bildausschnitte zu erhalten; unfixiertes Material verhält sich aber genau so. Es ist auch selbstverständlich, daß die Rückbettungskontrolle in Wasser ausgeführt wurde; hier verschwand die Innenstruktur stets wieder, so daß es sich nur um einen optischen Effekt handeln kann. Die Vermeidung der Umbettung durch Benutzung

[1] Natürlich ist die Intensität der Gesamtfärbung und damit der Kontrast geringer als bei Intensivfärbung, wie Abb. 15 im Vergleich zu Abb. 4, links, zeigt. — [2] Diese Zeitschr. 1, 252, 1930. — [3] Bei diesem bleibt die äußere Kontur zuweilen allerdings noch ein wenig sichtbar.

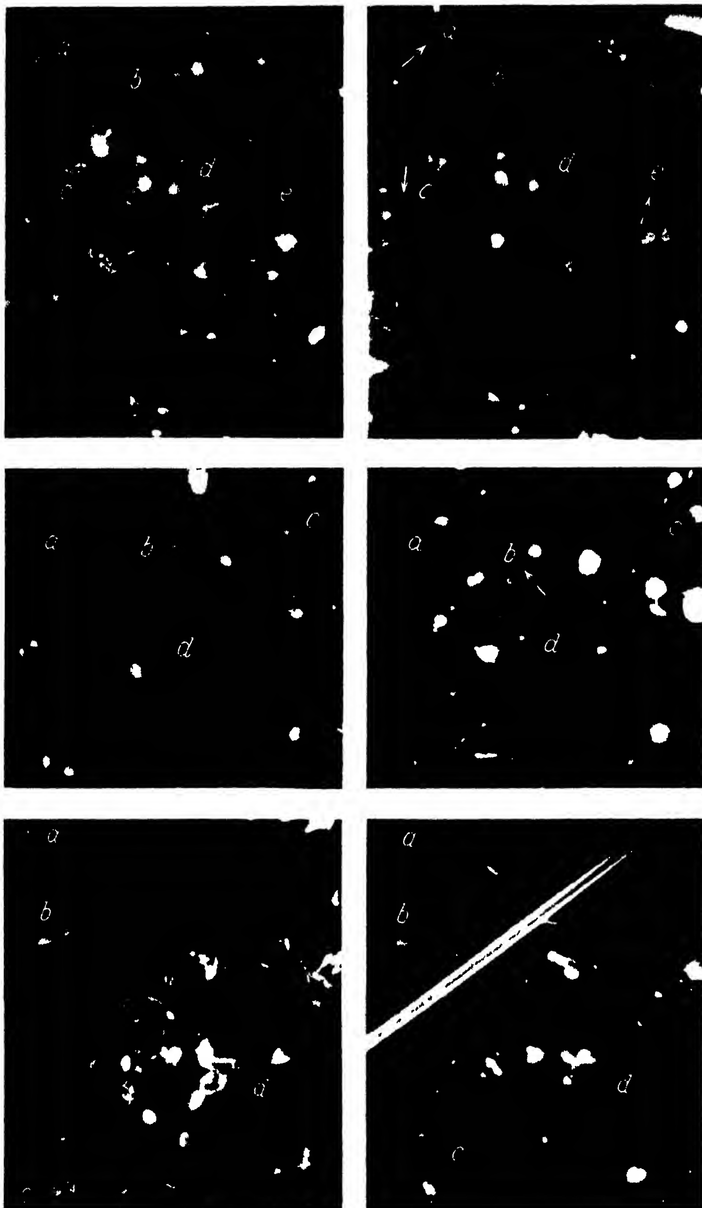


Abb. 16.

Sichtbarmachung der Innenstruktur nach *Eisenberg*. Angetrocknetes Präparat; linke Kolonne: Wasser-, rechte Kolonne: Zedernölpräparate· Dunkelfeld. Einige Bakterien haben sich bei der Umbettung verlagert, z. B. oben a und e, unten c.

einer Azimutblende nach *Eisenberg*[1] gelang, vermutlich infolge zu starker Lichtverluste, nicht. Bei den beigegebenen Aufnahmen ist ohnehin zu beachten, daß die Helligkeitswerte in den Bildern nicht den natürlichen Helligkeitswerten entsprechen; denn den Belichtungszeiten von etwa 2 bis 4 *Sekunden* bei den Wasserpräparaten stehen Belichtungszeiten von ebensoviel *Minuten* bei den Zedernölpräparaten gegenüber; dabei erforderten die Negative der letzteren stets noch eine Uranverstärkung, um die erwünschten Kontraste zu erhalten, schon weil die Plattensorte bei höherer Empfindlichkeit etwas flauer arbeitete.

Es ist nun interessant, daß „alternde" Formen, d. h. Formen, bei denen die Sporenbildung schon fortgeschritten oder fast vollendet ist, diese Anordnung der Inhaltskörper bereits im Wasserpräparat, also im optisch dünneren Medium, erkennen lassen; zunächst bleiben hierbei die peripheren Teile noch sichtbar, wenn sie auch an optischer Dichte

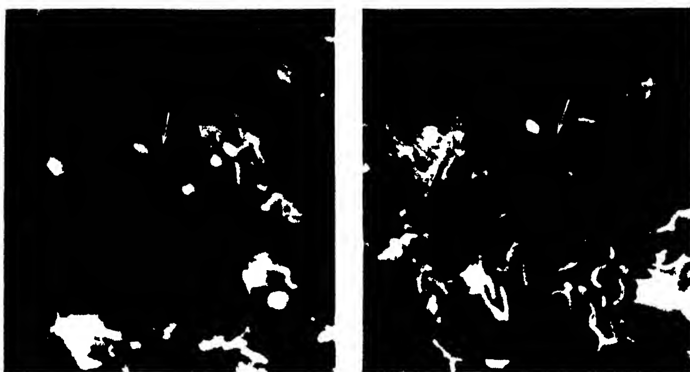


Abb. 17.
Altersformen des Cellulosezersetzers, links: die äußeren Partien beginnen optisch dünner zu werden; rechts: es ist, nach Ausbildung der Spore, nur noch das axiale Gerüst sichtbar. Natürliches Präparat; Wassereinbettung; Dunkelfeld.

verlieren. Mit zunehmendem „Alter" des Bakteriums scheinen sie aber ganz zu verschwinden, so daß sie dann den Zedernölbildern der intakten normalen Formen sehr ähneln. Abb. 17 zeigt solche Formen, bei denen man schon aus der Helligkeit der Spore auf deren optische und mechanische Dichte, und damit auf deren Reifezustand, schließen kann; im linken Teil der Abbildung ist eine Form zu sehen, in der neben den Inhaltskörpern die peripheren Teile der Zelle noch eben sichtbar sind, während in der entsprechenden Form der rechten Bildseite[2] nur die Inhaltskörper allein übrig geblieben zu sein scheinen. Die auf beiden Bildteilen in der Nachbarschaft liegenden intakten Stäbchen zeigen das gewohnte Dunkelfeldbild des Wasserpräparates. In alten Kulturen

[1] Diese Zeitschr. **3**, 401, 1933. — [2] Diese stellt selbstverständlich einen anderen Bildausschnitt dar.

findet man neben fertigen Sporen oft ungeheure Mengen feiner granulierter Fäden, die zuweilen zu dichten Haufen zusammengeballt liegen, und bei denen man oft nicht sagen kann, ob es sich um diese Inhaltskörper oder um die Reste der zerfallenen Cellulosefasern handelt. Die einzelnen Körnchen dieser Granula scheinen mechanisch ziemlich zugfest, aber biegsam miteinander verbunden zu sein, sie halten auch dann noch zusammen, wenn die peripheren Teile der Zelle längst unsichtbar geworden sind.

Hiernach scheint es so, als ob diese in der Zellachse liegenden Gebilde in dem Lebenslauf der Zelle eine weniger aktive Rolle spielen, sondern daß sie in der Hauptsache der mechanischen Stabilisierung des Organismus dienen, denn wir hatten gesehen, daß — soweit sich dies mit unseren optischen Hilfsmitteln überhaupt verfolgen läßt — für den Aufbau der Spore, in die doch offenbar nur die wertvollen, für den Lebensprozeß besonders wichtigen Stoffe hinein geleitet werden, lediglich die in den peripheren Teilen der Zelle befindlichen Stoffe verbraucht werden.





Abb. 18.
Volutinkörner: oben links und unten volutinfreie Trommelschlegel und volutinhaltige Stäbchen, oben rechts außer axiale Lagerung der Volutinkörner. Angetrocknetes Präparat in Wasser. Hellfeld.

Hierfür spricht ferner, daß mikrochemisch nachweisbare Reservestoffe, wie „Volutin“[1] sich ebenfalls nicht in den axialen Gebieten der Zelle zu befinden scheinen. Es ist bei den kleinen Dimensionen, mit denen wir es hier zu tun haben, und die sich der Auflösungsgrenze der Mikroskop-Optik sehr nähern, zwar außerordentlich schwer, etwas Sicheres über die räumliche Anordnung der Volutinkörnchen in der Bakterienzelle aus

[1] Mit Methylenblau färbbare Stoffe, die den Farbstoff nicht an 1%ige Schwefelsäure abgeben.

zusagen; die Abb. 18 zeigt aber eindeutig, daß wenigstens ein Teil dieser Körnchen außerhalb der Achse liegend gesehen wird (zum Vergleich kommen natürlich nur die durch einen Pfeil gekennzeichneten, in Scharfeinstellung befindlichen Stäbchen in Frage). Gibt man dies aber zu, so besteht, nach dem Bilde zu urteilen, die Möglichkeit, daß dann auch *alle* Volutinkörnchen außerhalb der Achse liegen.

Denn nimmt man an, daß die aus zwei zentrierten Zylindern bestehend gedachten Stäbchen in bezug auf die Rotation um die Achse alle möglichen Lagen im Präparat einnehmen können, und daß die (sehr klein gedachten) Volutinkörnchen auf dem Querschnitt des äußeren (Hohl-)Zylinders beliebig verteilt sein können, dagegen nicht auf dem Querschnitt des inneren Zylinders vorkommen sollen, so ist zwar zunächst die Wahrscheinlichkeit dafür, daß ein beliebig herausgegriffenes Volutinkörnchen im optischen

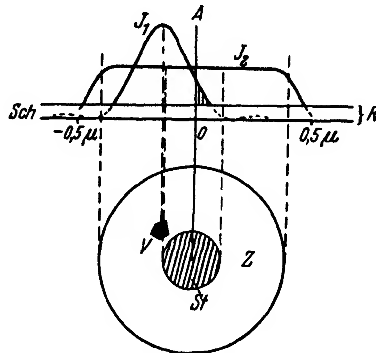


Abb. 19.
Abbildung eines im Stäbchen exzentrisch gelagerten Volutinkörnchens. *A* optische Achse, *St* Querschnitt durch den inneren Stabilisierungszylinder, *Z* Hohlzylinder der äußeren Stäbchenpartien, *V* Volutinkörnchen, *Sch* optischer Schnitt, J_1 Intensitätsverteilung im Bilde des Volutinkörnchens, J_2 Intensitätsverteilung im Bilde des Stäbchens, *R* physiologische Reizschwelle.

Schnitt in dem Bereich des inneren Zylinders liegt, etwa nur ein Drittel; dabei ist, den wirklichen Verhältnissen wohl am nächsten kommend, angenommen, daß der Durchmesser des inneren Zylinders ein Drittel des Durchmessers des Stäbchens beträgt. Berücksichtigt man aber, daß die für die Aufnahmen benutzte Optik (Öffnungszahl 0,95) nach der Theorie von *Abbe* Körper, die gegenüber der hier zu 0,6 μ angenommenen Wellenlänge des Lichtes klein sind, nur noch als „Beugungsscheibchen" abbildet, denen in der Objektebene fingierte Scheibchen von etwa 0,6 μ Durchmesser (gerechnet bis zum ersten Minimum) entsprechen, so wird im optischen Schnitt auch ein Teil *der* Körnchen als noch im Bereich des inneren Zylinders gesehen werden, die in Wahrheit schon außerhalb liegen. Der absolute Durchmesser des Stäbchens beträgt 0,8 μ; auch wenn das Beugungsscheibchen wegen der physiologischen Reizschwelle kleiner als 0,6 μ erscheinen mag, vielleicht 0,4 μ, so wird man wohl trotzdem in *mehr* als der Hälfte der möglichen Fälle die Volutinkörnchen *im* Bereich des inneren Zylinders liegen sehen; nur ganz seitlich liegende Körnchen wird man auch als solche wahrnehmen. Diese Verhältnisse soll, grobschematisch, Abb. 19 veranschaulichen; die Bilder des Stäbchens und Volutinkörnchens sind durch die entsprechenden Intensitätskurven angedeutet, deren gegenseitige Beeinflussung nicht berücksichtigt wurde. Erreichen die Volutinkörnchen die Größenordnung der Wellenlänge, so gelten diese Betrachtungen um so

mehr[1], desgleichen, wenn der Durchmesser des axialen Zylinders mehr als ein Drittel des Gesamtdurchmessers ausmacht. Vergleicht man in Abb. 18 in den drei (durch Pfeile gekennzeichneten) scharf eingestellten Stäbchen die Anzahl der scheinbar axial gelegenen mit der Anzahl der sicher exzentrisch gelegenen Volutinkörnchen, so ist das Verhältnis 6 : 5; dies widerspricht also nicht den anfangs gemachten Annahmen, und es besteht danach einige Wahrscheinlichkeit, daß die in axialer Lage gesehenen Volutinkörnchen nur *scheinbar* axial angeordnet sind.

Diese Annahmen gewinnen aber noch mehr an Wahrscheinlichkeit, wenn man die ebenfalls aus Abb. 18 hervorgehende Tatsache heranzieht, daß mit der Bildung der Spore, d. h. mit dem Verschwinden der peripheren Teile der Zelle auch die Volutinkörnchen verschwinden. Es kann demnach wohl kaum noch einem Zweifel unterliegen, daß *alle* lebenswichtigen Vorgänge in den peripheren Teilen der „Zelle" stattfinden, und daß die in der Achse angeordneten Substanzen *lediglich* der mechanischen Festigung des Bakteriums dienen. Man kann dies wohl aus der Lebensweise des Bakteriums erklären, welches sich, wie wir oben sahen, körperlich der Cellulosefaser anlegt; es müssen demnach auch die wichtigsten enzymatischen Prozesse unmittelbar an der Oberfläche des Bakteriums stattfinden. Daß celluloselosende Enzyme aus dem Bakterium austreten, ist deswegen unwahrscheinlich, weil immer nur diejenigen Fasern zerfallen, die mit den Bakterien in direkte Berührung kommen[2]. Daß sich der gelbe Farbstoff nur in den peripheren Teilen befindet, war bereits erwähnt.

Es bleibt noch die Frage übrig, ob diese Bakterien außer der axialen Stabilisierung noch über eine Membran als mechanische Festigung verfügen. Es wurde versucht, diese Frage auf mechanischem Wege zu entscheiden, da es auf optischem ziemlich aussichtslos erscheint. Ein sehr feiner, unter 0,5 μ starker Glasfaden, der mit dem Mikromanipulator geführt wurde, diente dazu, ein einzelnes Bakterium anzustechen oder zu zerteilen. Befindet sich das Bakterium jedoch in einer größeren Menge Flüssigkeit, so gelingt dies auf keine Weise, selbst wenn man versucht, das Bakterium zwischen dem Deckglas und dem möglichst kurz gefaßten Glasfaden einzuklemmen. Das Bakterium weicht stets wie ein biegsamer, aber sehr zug- und druckfester Gummischlauch[3] aus. Läßt man aber die Flüssigkeit soweit eintrocknen, daß das einzelne Bakterium noch gerade in den einzelnen Tropfen hineinpaßt, so genügt bereits die leiseste Berührung, um das Bakterium vollständig zerfließen zu lassen. Wäre eine Membran vorhanden, mechanisch fest

[1] Aus der Intensität der Färbung ist zu schließen, daß die Volutinkörnchen nicht sehr klein sind; immerhin wird selbst ihre grobere Struktur noch nicht aufgelöst. — [2] Auch *Khouvine* zieht aus der gleichen Beobachtung den Schluß, daß das cellulosespaltende Enzym nur ein Endoenzym sein kann. — [3] Vgl. *Wámoscher*, Zeitschr. f. Hyg. 111, 422, 1930.

genug, die Gestalt der Zelle zu bestimmen, so müßte wenigstens in einem Teile des zertrümmerten Bakteriums die ursprüngliche Form noch vorhanden sein; dagegen würde sich bei der geringsten Beschädigung die Stabilisierungsachse unter dem Einfluß der enorm gewachsenen Oberflächenkräfte in dem Tropfen aufrollen oder einknicken. Aus mechanischen Gründen erscheint daher die Hypothese einer Membran für die normale Form dieser Cellulosezersetzer entbehrlich[1]. Hinzu kommt noch, daß die optische Dichte und damit sicher auch die mechanische Dichte und Festigkeit der äußeren Begrenzung bei den alternden Formen zurückgeht, während die Gestalt unverändert erhalten bleibt, selbst dann noch, wenn die äußere Begrenzung nicht mehr sichtbar ist (Abb. 17, rechts); eine mechanisch stabil bleibende Membran ließe dagegen erwarten, daß eine annähernd gleiche optische Dichte beibehalten würde, oder aber eine in ihrer mechanischen Festigkeit sich ändernde Membran müßte gleichzeitig mit Abnahme der optischen Dichte eine Gestaltsveränderung mit sich bringen.

Man kann sich den Vorgang der Sporenreifung nur so vorstellen, daß gleichzeitig mit dem Abtransport der lebenswichtigen Stoffe die peripheren Teile des Bakteriums in dem Maße verquellen, wie eben jene Stoffe fortgeleitet werden.

Neben der immer nachweisbaren axial gelagerten Substanz und den sich regelmäßig in den jungen Formen findenden Volutinkörnchen wurden andere als Reservestoffe dienende Inhaltskörper wenig gefunden. In einzelnen Fällen konnten mit Jod sich gelbbraun färbende Stoffe (Glykogen) in jüngeren Stäbchen nachgewiesen werden; diese fanden sich nie in einzelnen Körnchen, sondern stets in zusammenhängenden, einen Teil der Zelle ausfüllenden Massen. Besonders interessant ist aber, daß auch in zwei Fällen mit Jod sich *blau* färbende Inhaltskörper (Iogen) nachgewiesen werden konnten. Die Formen der 90. Überimpfung der B-Reihe zeigten eine schwache Abweichung nach der Spindelform und waren dadurch ausgezeichnet, daß sie je Zelle mehrere Kügelchen mit Jod sich blau färbender Substanz enthielten. Im allgemeinen gaben sowohl die normalen Formen wie die Spindeln im Jugendstadium und die in Fleischwasser gewachsenen Spindeln nur die gelbe Eiweißfärbung. Die Abimpfung von dieser Kultur war wieder normal und besaß keine solche Inhaltskörper. Erst in der 93. Überimpfung der B-Reihe traten neben den normalen Formen fädige Formen auf, die ebenfalls, aber auch nur sie allein, mit Jod blau färbbare Inhalts-

[1] Dies läßt sich natürlich nicht auf alle Bakterien verallgemeinern; denn man findet z. B. oft alte „leere“ Zellen von *B. mycoides*, die im Dunkelfeld neben der intensiv leuchtenden äußeren Begrenzung in lebhaft *Brown*scher Bewegung befindliche Inhaltskörper zeigen.

körper besaßen in einer Anordnung, wie das Abb. 20 zeigt. Von anderen Autoren wird über das Vorkommen solcher Inhaltskörper bei den Cellulosezersetzern nichts berichtet, außer von *Clausen*, der sie aber nur bei *Amylobacter navicula* findet; die anderen Cellulosezersetzer sollen sich nach seinen Untersuchungen weinrot färben; dieses kann ich für die hier untersuchten Cellulosezersetzer aber in keinem Falle bestätigen.



Abb. 20.
Fädige Form mit Inhaltskörpern, die sich mit Jod blau färben. Natürliches Präparat in Jod-Jodkali; Hellfeld.

Gasstoffwechsel.

Es wurde bereits erwähnt, daß den Schlüssen, die *Omeliansky* aus seinen gasanalytischen Untersuchungen in bezug auf die Methanbildung zog, Bedenken anhaften. *Kellerman - Mc Beth* isolierten aus *Omelianskys* Kultur drei verschiedene, unter der Sauerstoffspannung der Luft gedeihende Cellulosezersetzer, von denen aber keiner Gas zu bilden imstande war; jedoch scheint auch die Stichhaltigkeit *dieser* Ergebnisse zweifelhaft. *Khouvine* arbeitet nur mit erhitztem Impfmaterial, ihre Analysen können also in der Frage der Methanbildung keine Entscheidung bringen; das gleiche gilt von den in dieser Abhandlung mitgeteilten Analysen. Dagegen haben *Werner* und *Clausen* vergleichbare Untersuchungen, die in der Tat ergeben, daß *Omelianskys* Schlüsse nicht zutreffen können, daß also die *Reinkultur* der Cellulosezersetzer auch bei nicht erhitztem Impfmaterial kein Methan zu bilden vermag. Das Auftreten dieses Gases kann daher nur auf der Mitwirkung von Begleitorganismen beruhen. Auch die mit thermophilen Cellulosezersetzern arbeitenden Forscher finden kein Methan. *Coolhaas* kann nur in den ersten, noch unreinen Überimpfungen Methan nachweisen; mit zunehmender Reinheit der Kultur verschwindet die Methanbildung.

In der Tabelle I sind die Ergebnisse einiger Autoren zusammengestellt; es geht daraus hervor, daß die Analysen auch in anderer Hinsicht voneinander abweichen.

Diese Werte, die einen unmittelbaren Vergleich der verschiedenen Analysenangaben gestatten, zeigen, daß z. B. die Gesamtmenge Gas, die bei der Vergärung einer bestimmten Menge Cellulose frei wird, in den Versuchen der verschiedenen Autoren erheblichen Schwankungen unterworfen ist. Noch mehr als das Gesamtgasvolumen schwankt die auf die gleiche Weise berechnete Menge Wasserstoff. Man erhält fast

Tabelle I.

Autor	Jahr	1 Gesamt-cellulose z g	2 Rest-cellulose r g	3 Volumen der Nährlosung V ccm	4 Volumen Gesamt-gas G g	5 CO_2 Vol.-%	6 H_2 Vol.-%	7 CH_4 Vol.-%	8 N_2 Vol.-%	9 $\frac{G + V/4}{z - r}$	10 $\frac{\text{Vol. } H_2}{z - r}$
Omeliansky[1], unerhitzt	1902	2,1	0,1	500	552	65	0	35	—	339	—
„ erhitzt	1902	3,5	0,1	300	810	81	19	0	—	260	45
Kroulik[2, 5]	1913	20	(5,0)[6]	1000	(2500)[6]	57	43	0	—	275	108
Pringsheim[3, 5]	1913	3	(0,8)[6]	1500	137	39	61	0	—	233	38
Khouvine[1]	1923	3	2,0	300	290	56	36	0	8	365	105
Werner[1]	1926	2	0,5	400	300	54	41	0	5	265	80
Coolhaas[4, 5]	1928	Keine quantitativen Versuche									
Clausen[1], *Omeliansky* — Bakt.	1931	Methan nicht gefunden; Analysendaten fehlen									
„ *Amyl. navic.*	1931	1	(0,25)[6]	250	250	43	53	0	?	417	176
Cowles-Rettger[1]	1931	1,2	0,75	240	130	25	75	0	—	460	240
Meyer, B_{40}	1932	2	(0,5)[6]	250	25	44	12	0	43	59	2
„ B_{93}	1933	2	0,5[7]	250	169	87	0,4	0	15	159	0,5
„ B_{93}	1933	2	0,4[7]	250	46	53	0	0	46	77	0

Die Spalte 9 gibt das Verhältnis: Gesamtgasvolumen zu vergorener Cellulose, Spalte 10 das Verhältnis: Wasserstoffvolumen zu vergorener Cellulose an. Zum Volumen der aufgefangenen Gesamtgasmenge wurde noch $^1/_4$ des Volumens der Nährlösung hinzugefügt, da diese nach *Werner*[1] etwa soviel Kohlendioxyd gelost enthält.

---

[1] Vgl. die Literaturangaben S. 1 bis 5. — [2] Centralbl. f. Bakt. II, 36, 339, 1913. — [3] Ebenda II, 38, 513, 1913. — [4] Ebenda II, 76, 38, 1928. — [5] Thermophile Cellulosezersetzer. — [6] Schätzungswerte; durch Unglücksfall ging die Restcellulose von B_{40} verloren. — [7] Bestimmt durch Abfiltrieren des Rückstandes von der restlichen Nährlösung und Auswaschen des Filterrückstandes mit verdünnter Salzsäure.

den Eindruck, daß der Vorgang der Gasbildung gar nicht unmittelbar mit der Zersetzung der Cellulose zusammenhängt, sondern durch die zufällige Konstellation irgendwelcher Nebenfaktoren bedingt wird: die Kulturen mögen entweder noch weitere, schwer abtrennbare Begleitorganismen enthalten, oder aber die Cellulosezersetzer selbst setzen sich aus einer großen Anzahl morphologisch wenig verschiedener, physiologisch dagegen mehr voneinander abweichender Gruppen von Organismen zusammen, deren Anteilsverhältnisse von Kultur zu Kultur wechseln können; es ist ferner auch denkbar, daß sich die Eigenschaften dieser Organismen zeitlich verändern. Diese Fragen lassen sich erst mit dem Gelingen von Einzellkulturen beantworten. Bei meinen Versuchen fallt die geringe Menge des Gesamtgases und in der 93. Überimpfung das Ausbleiben der Wasserstoffentwicklung auf, obgleich die Cellulose in dieser hohen Überimpfung, wenn auch träge, so doch nicht weniger vollständig vergoren wurde als bei den anderen Versuchsanstellern.

Daß bei den hohen Überimpfungen das Farbstoffbildungsvermögen verloren geht, wurde bereits erwahnt. Auch die Inkubationszeit wird langer, sie betrug in der B-Reihe etwa 4 bis 5 Tage im Minimum (B_{44} und B_{45}), bei der 90. Überimpfung etwa 4 Wochen, die Überimpfung B_{97} ist zur Zeit nach 10 Wochen seit der Impfung noch nicht angewachsen. Die Fleischwasserkulturen lassen sich dagegen mit unveranderter Virulenz weiterziehen; die Inkubationszeit betragt 2 bis 3 Tage.

Man kann demnach feststellen, daß in der Reinkultur die Cellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung nicht nur *nicht* von einer Methanentwicklung begleitet ist, sondern daß sie auch ohne Bildung von *Wasserstoff* vor sich gehen *kann*.

Da wahrend der Kultur der Cellulosezersetzer beobachtet wurde, daß bald nach der Überimpfung ein Unterdruck in dem Kulturgefaß entsteht, wurde bei den gasanalytischen Versuchen Vorsorge getroffen, daß dieser Unterdruck meßbar verfolgt werden konnte (Abb. 21). Etwa 50 Stunden nach der Überimpfung war bereits der größte Unterdruck von 110 mm Hg erreicht. Berucksichtigt man, daß mit dem Einbringen des Kulturgefäßes in den Brutraum, d. h. mit Erhöhung der Temperatur von etwa 18 auf 37° C, die Tension des Wasserdampfes um etwa 31 mm Hg steigt, so ergibt sich, daß fast der gesamte Sauerstoff — denn nur dieser kommt in Betracht — verbraucht sein muß. Die Gasanalyse bestätigt dies.

Die Gasnalyse wurde nach den technischen Methoden ausgeführt[1], da diese für den vorliegenden Zweck genau genug sind. Als Sperrflüssigkeit

[1] *Zsigmondy-Jander*, Kurzer Leitfaden der technischen Gasanalyse. Braunschweig 1920.

für die *Hempel*sche Bürette diente bis zur Absorption der wasserlöslichen Bestandteile die restliche Nährlösung, später destilliertes Wasser. Analysiert wurde nur die *aufgefangene* Gasmenge, da es nur auf die qualitative Zusammensetzung des Gases im wesentlichen ankam. Der über der Nährflüssigkeit verbliebene Gasrest wird in der Hauptsache nur noch aus Kohlendioxyd bestanden haben. Der Wasserstoff wurde in der *Hofmann*schen Chloratpipette, etwaiges Methan in der Explosionspipette, die anderen Gase in den üblichen Absorptionsmitteln bestimmt.

Die Zusammensetzung des Gases wurde bei der 40. und bei der 93. Überimpfung der B-Reihe bestimmt; die summarischen Ergebnisse der Analyse finden sich in Tabelle I. Den zeitlichen Verlauf der Unterdruck- und Gasbildung, umgerechnet auf Volumina von 760 mm Hg und 0° C, zeigt Abb. 21 für die beiden Parallelversuche der 93. Über-

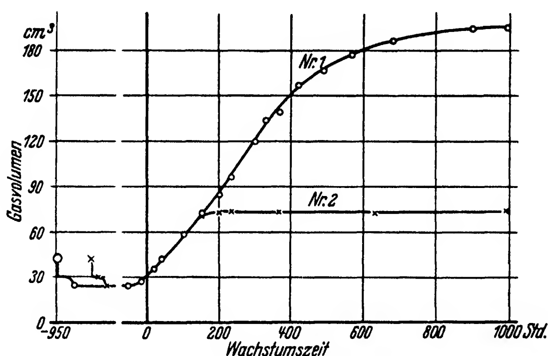


Abb. 21.

Zeitlicher Verlauf der Gesamtgasbildung in der 93. Überimpfung der B-Reihe. Der Unterdruck wurde durch entsprechende Volumverminderung der über der Nährlösung belassenen Luft zum Ausdruck gebracht. ♀ Zeitpunkt der Beimpfung von Nr. 1, × Zeitpunkt der Beimpfung von Nr. 2.

impfung. Als Anfangspunkt wurde der Augenblick gewählt, in dem der anfangs entstandene Unterdruck durch die Gasbildung, die zu diesem Zeitpunkte also schon einige Stunden im Gange war, gerade ausgeglichen war. Es ist dazu zu bemerken, daß in der Abbildung der Beginn der Gärung der beiden Parallelen nicht nur durch die Wahl dieses Anfangspunktes, sondern auch *absolut* zusammenfällt, obgleich die Parallele Nr. 2 erst 3 Tage später geimpft wurde als Nr. 1; das ist aber sicher ein — allerdings sehr merkwürdiger — Zufall, da eine gegenseitige Beeinflussung der Kulturgefäße ausgeschlossen erscheint.

Die gesamte Gasmenge der 40. Überimpfung wurde in einer, die der 93. Überimpfung bei der einen Parallelen in vier, bei der anderen in zwei Portionen aufgefangen. Die auf 760 mm Hg und 0° C reduzierten Volumina der Zusammensetzung zeigt Tabelle II.

Tabelle II.

Analyse des aus der 40. Überimpfung aufgefangenen Gases.

Nr. 1.			Nr. 2.		
Gesamt	25,2 ccm		Gesamt	19,7 ccm	
CO_2	11,1 „	43,8 Vol.-%	CO_2	4,4 „	22,6 Vol.-%
H_2	3,0 „	11,9 „	H_2	1,7 „	8,7 „
CH_4	0,0 „	0,0 „	CH_4	0,0 „	0,0 „
O_2*	0,5 „	2,0 „	O_2	1,8 „	9,2 „
N_2*	10,6 „	42,7 „	N_2	11,8 „	60,7 „

Analyse des aus der 93. Überimpfung aufgefangenen Gases.

Nr. 1.

1. Portion: 139 Stunden.			2. Portion: 301 Stunden.		
Gesamt	36,4 ccm		Gesamt	54,2 ccm	
CO_2	19,2 „	52,8 Vol.-%	CO_2	64,5 „	85,8 Vol.-%
H_2	0,0 „	0,0 „	H_2	0,3 „	0,6 „
CH_4	0,0 „	0,0 „	CH_4	0,0 „	0,0 „
O_2	0,2 „	0,5 „	O_2	0,6 „	1,1 „
N_2	17,0 „	46,7 „	N_2	6,8 „	12,5 „

3. Portion: 527 Stunden.			4. Portion: 995 Stunden.		
Gesamt	52,2 ccm		Gesamt	25,8 ccm	
CO_2	50,7 „	97,1 Vol.-%	CO_2	25,2 „	97,7 Vol.-%
H_2	0,4 „	0,8 „	H_2	0.0 „	0,0 „
CH_4	0,0 „	0,0 „	CH_4	0,0 „	0,0 „
O_2	0,0 „	0,0 „	O_2	0,0 „	0,0 „
N_2	1,1 „	2,1 „	N_2	0,6 „	2,3 „

Nr. 2.

1. Portion: 139 Stunden.			2. Portion: 995 Stunden.		
Gesamt	39,4 ccm		Gesamt	6,2 ccm	
CO_2	19,6 „	49,8 Vol.-%	CO_2	4,7 „	75,8 Vol.-%
H_2	0,0 „	0.0 „	H_2	0,0 „	0,0 „
CH_4	0,0 „	0,0 „	CH_4	0,0 „	0,0 „
O_2	0,2 „	0,5 „	O_2	0,0 „	0,0 „
N_2	19,6 „	49,7 „	N_2	1,5 „	24,2 „

Die Tabelle II zeigt, daß sogar innerhalb der einzelnen Parallelkulturen die Gesamtgasmengen außerordentlich stark schwanken können; das geht auch aus den Beobachtungen der anderen Versuchsansteller hervor. Ob die geringe Menge Wasserstoff, die in B_{93} Nr. 1 gefunden wurde, außerhalb der Analysenfehler liegt, ist zweifelhaft.

Gegen das Fehlen des Wasserstoffes läßt sich allerdings der Einwand erheben, daß bei den vorliegenden Versuchen — im Gegensatz zu den Versuchen anderer Autoren — eine relativ große Menge Luft über der

* Der Sauerstoff und Stickstoff stammen aus der über der Nährlösung belassenen Luft (vgl. S. 189), die in B_{40} etwa 15 ccm, in B_{93} 30 ccm beträgt.

Nährlösung belassen wurde, und daß durch den Sauerstoff der entstehende Wasserstoff oxydiert würde[1]. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß z. B. bei B_{93} die gesamte zur Verfügung stehende Menge Sauerstoff bereits 50 Stunden nach der Überimpfung aufgebraucht ist, während die Gärung erst nach 845 Stunden einsetzt. Es sei denn, man nähme einen Sauerstoffüberträger an, der den Sauerstoff so lange festzuhalten vermag, bis die Wasserstoffentwicklung einsetzt.

Man könnte dabei z. B. an den gelben Farbstoff denken[2], aber dieser wird auch erst bei Beginn der Gärung, und bei den hohen Überimpfungen, bei denen ebenfalls der anfängliche Unterdruck entsteht, überhaupt nicht mehr gebildet. Vielleicht wird der Sauerstoff von den „keimenden" Sporen, vielleicht aber auch durch die „Restatmung"[3] der Sporen verbraucht; für diese Annahme spricht die Beobachtung, daß in längst ausgegorenen Kulturen sich wieder ein Unterdruck herstellt und auch wieder von neuem entsteht, wenn durch vorübergehendes Öffnen des Kulturgefäßes der Druckunterschied ausgeglichen war.

Bei der Cellulosezersetzung unter niedriger Sauerstoffspannung wird nur ein Teil der Cellulose verbraucht. Die Menge der unvergorenen Cellulose wird bei den verschiedenen Versuchsanstellern aber sehr verschieden angegeben (vgl. Tabelle I); *Khouvine* findet, daß mit zunehmender Reinheit der Kultur der unvergorene Anteil der Cellulose wächst. In der Tat ist bei *Khouvine* der Celluloserest sehr groß. Es müssen dabei aber noch andere Faktoren mitgespielt haben; denn selbst in der 93. Überimpfung der B-Reihe werden immer noch drei Viertel der Gesamtcellulose verbraucht gegenüber einem Drittel bei *Khouvine*. In die Restcellulose einbezogen sind die Überbleibsel der Bakterien, die noch an den Fasern haften.

Das mikroskopische Bild der Restcellulose, die ein lockeres Gefüge besitzt[4], ist dem der unangegriffenen Cellulose sehr ähnlich. Man findet die Fasern zum Teil noch dicht mit Bakterienresten besetzt, und, in der Einbettungsflüssigkeit herumschwimmend, kleinere Trümmerstücke der Cellulosefasern, die sich im polarisierten Lichte als solche nachweisen lassen. Auch gegenüber Chlorzinkjod verhält sich die Restcellulose wie intakte Cellulose; der Farbton ist wegen der anhaftenden

---

[1] *Kroulik* (Centralbl. f. Bakt. II, **36**, 339, 1913) findet zwar, daß umgekehrt bei seinen „aeroben" thermophilen Cellulosezersetzern mit sinkender Sauerstoffspannung schließlich neben Kohlendioxyd auch Wasserstoff auftritt, jedoch kann man über die Reinheit seiner Kultur im Zweifel sein. — [2] Vgl. *Warburg* u. *Christian*, Biochem. Zeitschr. **260**, 499, 1933; **254**, 438, 1932. — [3] Vgl. *Sevag*, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. **114**, 756, 1933. — [4] Eine Verquellung der Restcellulose, wie sie *Werner* angibt, wurde hier nicht beobachtet.

Bakterienreste etwas ins Bräunliche verschoben; die Färbung ist, wie die der intakten Cellulose, dichroitisch. Es ist daher anzunehmen, daß die Cellulosefaser bei der Gärung zunächst nur in kleinere Stücke aufgespalten wird, wobei der micellare Aufbau erhalten bleibt, und daß die Teilstücke erst später, wenn sie submikroskopische Größe erreicht haben, chemisch abgebaut werden. Unmittelbar *Fehling*sche Lösung reduzierende Zucker konnten in der restlichen Nährlösung nicht nachgewiesen werden[1]. Die Säurebildung wurde nicht untersucht.

Schlußbetrachtungen.

Obgleich das hier beschriebene cellulosezersetzende Bakterium gegenüber den in der Literatur beschriebenen mancherlei Eigentümlichkeiten aufweist, möchte ich hier doch von dem sonst in solchen Fällen üblichen Wege, den Organismus nunmehr als neue Art zu betrachten und neu zu benennen, abweichen; denn dieses Verfahren bleibt solange fruchtlos, wie wir nicht für die Artbestimmung und -abgrenzung der Bakterien eindeutige Kriterien haben. Es sollte in der Abhandlung vielmehr das *Gemeinsame* dieser Gruppe von Bakterien hervorgehoben werden[2], und es sollte unsere bisher in der Hauptsache auf das *physiologische* Gebiet begrenzte Kenntnis nach der *morphologischen* und *cytologischen* Seite hin erweitert werden. Es hat sich dabei gezeigt, daß der Aufbau der Zelle der Cellulosezersetzer in mancher Hinsicht von dem Bau der Bakterienzelle abweicht, wie wir ihn sonst gewohnt sind, uns vorzustellen[3].

Es sei hier noch kurz auf die Beziehungen hingewiesen, welche die Gruppe dieser Cellulosezersetzer mit der *Amylobacter*-Gruppe zu verbinden scheinen. Beide Gruppen weisen ja in mehrfacher Hinsicht auf physiologischem wie auf morphologischem Gebiet (vgl. S. 195) einige Ähnlichkeiten auf; *van Tieghem*[4] hielt sogar *Amylobacter* für den Cellulosezersetzer. Man hat nach *Bredemann*[5] als besonderes Kennzeichen der *Amylobacter*-Gruppe die Blaufärbbarkeit mit Jod anzusehen,

---

[1] Nach *Pringsheim* soll der Abbau der Cellulose über Cellobiose und Glucose führen, dagegen findet *Werner* keine einfachen Zucker als Zwischenprodukte beim Celluloseabbau. Beim Celluloseabbau unter der Sauerstoffspannung der Luft sind Zucker als normale Zwischenprodukte nachgewiesen. — [2] Auch *Clausen* macht einen entsprechenden Vorschlag. — [3] Diese Vorstellungen enthalten aber sicher noch viele der reinen Phantasie entlehnte Elemente, da man z. B. in der Literatur manche Inhaltskörper der Bakterienzelle in Einzelheiten beschrieben findet, während diese Inhaltskörper selbst mit der besten uns zur Verfügung stehenden Optik kaum einigermaßen geometrisch ähnlich abgebildet werden können. Man vergleiche in dieser Beziehung z. B. die Ausführungen von *Enderlein* (Bakterien-Cyclogenie. Berlin-Leipzig 1925). — [4] Bull. de la Soc. Bot. de France **26**, 25, 1879. — [5] Centralbl. f. Bakt. II, **28**, 385, 1909.

ein Kennzeichen, das zwar den Cellulosezersetzern im allgemeinen fehlt. Wir hatten aber gesehen, daß diese Eigenschaft gelegentlich doch einmal auftritt (vgl. S. 213); andererseits hängt bekanntlich die Blaufärbbarkeit mit Jod auch bei der *Amylobacter*-Gruppe u. a.[1] von den Ernährungsbedingungen ab: so findet man in fast jeder Kultur des *Amylobacter* Stäbchen, die sich bis auf die Sporenanlage vollständig, andere, die sich nur granuliert färben, und schließlich weitere, die höchstens eine Andeutung von Iogen zeigen. Es wäre daher durchaus denkbar, daß unsere Cellulosezersetzer sich aus der *Amylobacter*-Gruppe abgespalten haben, indem bei sehr langem Bestehen einseitiger Ernährungsbedingungen die Fähigkeit zur Iogenbildung verloren ging und nur gelegentlich — gewissermaßen „atavistisch" — in einer Generation wieder auftritt. Die große Variabilität beider Bakteriengruppen legt solche und ähnliche Zusammenhänge nahe.

Für die Unterstützung und Ratschläge bei der Ausführung dieser Untersuchungen bin ich Herrn Professor *Rippel* zu großem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

Aus den Anreicherungskulturen der cellulosezersetzenden Bakterien wurde ein *Actinomycet* isoliert, der ebenfalls die Cellulose intensiv zersetzt; es konnte aber nachgewiesen werden, daß die Bakterien nicht auf die Vorarbeit dieses *Actinomyceten* angewiesen sind.

Die cellulosezersetzenden Bakterien wachsen in Cellulose-Minerallösung und auf Filterscheiben oder Cellulosebrei in Wasserstoff. Die „normalen" Formen haben Stäbchen- oder Trommelschlegelgestalt und stimmen mit den sonst in der Literatur beschriebenen Formen im wesentlichen überein. In den gleichen Nährmedien treten aber auch „abweichende" Formen auf, die entweder fädig entartet sind oder Anschwellungen aufweisen, ähnlich wie sie von *Tetrault* beschrieben wurden. Die „Jugendformen" des Cellulosezersetzers sind spindelförmig und lebhaft beweglich, sie treten nur für sehr kurze Zeit in der Kultur auf und heften sich bald der Faser an.

In Fleischwasser wachsen die Cellulosezersetzer nur in Spindelform; normale Formen zerfallen darin, und bereits fertige Sporen entwickeln sich zu Spindeln. Sie verlieren selbst nach 33facher Überimpfung in Fleischwasser nicht die Fähigkeit zur Cellulosezersetzung. In D-Agar wurden neben Stäbchen fädige Abweichungen mit mittelständiger Anschwellung erhalten.

Die Farbstoffbildung ist von Kultur zu Kultur und im Verlaufe der Wachstumszeit wechselnd. Örtlich ist die Farbstoffbildung, für die

[1] Vgl. *Svartz*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., 125, 115, 1932.

eine gewisse Sauerstoffspannung notwendig zu sein scheint, wahrscheinlich an die äußeren Teile der Bakterienzelle gebunden. Der Farbstoff geht auch auf die Cellulosefaser über, ist aber mit den gebräuchlichen Lösungsmitteln nicht extrahierbar.

Die Innenstruktur des Bakteriums wurde nach dem Verfahren von *Eisenberg* untersucht. Die Bakterienzelle besitzt eine axial angeordnete Substanz, die vermutlich nur der mechanischen Festigung der Zelle dient, und die nach der Sporenbildung allein zurückbleibt. Die für den Lebensablauf der Zelle wichtigen Stoffe, wie z. B. Volutin, befinden sich wahrscheinlich nur in den peripheren Teilen der Zelle und verschwinden bei der Sporenbildung. Die Existenz einer Membran neben der Festigungsachse erscheint bei diesen Cellulosezersetzern fraglich. Neben Volutin wurden noch in wenigen Fällen Glykogen und Iogen nachgewiesen, was neben anderem auf „verwandtschaftliche" Beziehungen zur *Amylobacter*-Gruppe hindeutet.

Der Gasstoffwechsel der hier besprochenen Cellulosezersetzer ist dadurch bemerkenswert, daß die Gesamtgasmenge gering ist im Vergleich zu den Ergebnissen der meisten anderen Autoren, und daß bei einer hohen Anzahl von Weiterimpfungen auch das Vermögen zur Wasserstoffbildung verloren geht, so daß als einziges gasförmiges Gärprodukt Kohlendioxyd verbleibt, wobei aber noch die Möglichkeit einer Mitwirkung von Sauerstoff zu berücksichtigen ist.

(Aus dem Institut für Biochemische Technologie an der Technischen Hochschule in Wien, dem Institut für Landwirtschaftlich-chemische Technologie an der Hochschule für Bodenkultur in Wien und der Biologischen Station Lunz am See.)

Mikrobiologische Bodenuntersuchungen im Lunzer Gebiet[1].

I. Allgemeiner Teil:

Ziel und Methodik der Untersuchungen. Standortsfaktoren und Keimgehalt.

Von

Alexander Janke, Franz Sekera und Armin Szilvinyi.
Unter Mitwirkung von **Maria Wozak.**

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. November 1933.)

A. Die ökologische Fragestellung und das Kleinklima als biologischer Standortsfaktor.

1. Die ökologischen Faktoren.

Nach einer Periode vorwiegend beschreibender mikrobiologischer Bodenuntersuchungen wurde in neuerer Zeit auch auf diesem Forschungsgebiet die Wichtigkeit der ökologischen Fragestellung erkannt; so trachtet man Vorkommen und Wirkung der Bodenmikroben in Abhängigkeit von der Umwelt zu studieren. Es liegt jedoch zurzeit noch wenig in dieser Hinsicht brauchbares Material vor.

Wie bei den höheren Pflanzen[2] lassen sich auch bei den Mikroben die ökologischen Faktoren in *klimatische* (atmosphärische), *edaphische* und *biotische* unterscheiden, je nachdem, ob sie auf das Klima, den Boden oder höher organisierte Lebewesen Bezug nehmen.

Diese Faktoren stellen jedoch keineswegs voneinander unabhängige Umwelteinflüsse dar, vielmehr bestehen zwischen ihnen Zusammenhänge und zwar derart, daß die edaphischen Faktoren durch das Klima und die biotischen durch Klima und Boden mit bestimmt sind. So kommen die klimatischen Standortsbedingungen nicht nur unmittelbar zur Auswirkung durch die Einflüsse, die sie *gegenwärtig* auf die Mikrobenwelt ausüben. sondern auch indirekt, indem sie *in der Vergangenheit* in die Bodenbildung eingegriffen und so jene Bodeneigenschaften mit geformt haben, die wir als „*edaphische Faktoren*“

[1] Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft. — [2] Vgl. z. B. *H. Lundegårdh*, Klima und Boden und ihre Wirkung auf das Pflanzenleben, 2. Aufl. Jena 1930.

bezeichnen. Es ist zunächst sicher, daß der gesamte Vorgang der Gesteinsverwitterung und der sich anschließende Prozeß der Entbasung der Verwitterungsprodukte vom Klima in bestimmte Bahnen gelenkt wird. Ein gleiches gilt auch von den Abbauprozessen, denen die im Boden immer von neuem anfallende organische Substanz pflanzlichen und tierischen Ursprungs unterliegt, so daß das Klima auch an der Bereitung der für die Mikroben erforderlichen Kohlenstoffquellen beteiligt ist. Der vom Klima diktierte Basenhaushalt bedingt zunächst schon durch die Schaffung einer für den Standort charakteristischen H-Ionenkonzentration eine Selektionierung des Mikrobenbestandes. Hand in Hand mit dem Basenhaushalt des Bodens unterliegt dieser jenen *Dispersitätsänderungen*, die seit langem als hervorragendste Bodeneigenschaft gelten; das Klima schuf demnach mittelbar nicht nur die wirksame Oberfläche des Bodens, sondern auch die Struktur seiner Kapillarräume, die von den Mikroorganismen bewohnt sind. Da weiterhin in diesen Kapillarräumen sich sowohl die Luft- als auch die Wasserzirkulation vollzieht, gewinnen die klimatisch bedingten Dispersitätsänderungen auch Einfluß auf die aeroben oder anaeroben Bedingungen des Mikrobenlebens. Und da der Wasser- und Lufthaushalt des Bodens letzten Endes auch dessen Wärme-Ein- und -Ausstrahlung regelt, werden auf diesem Wege die Schwankungen des atmosphärischen Temperaturganges und der Wasserzufuhr in verschiedenem Ausmaße ausgeglichen und humide oder aride Lebensbedingungen fur die Organismenwelt geschaffen.

Die durch das Klima fruherer Zeiten dem Boden aufgezwungene Beschaffenheit hat demnach fur das Leben aller — auch der höheren — bodenstandigen Organismen entscheidende Bedeutung, so daß im biotischen Faktor auch eine klimatische und edaphische Komponente mitwirkt.

2. Das Kleinklima als biologischer Standortsfaktor.

Wenn man von dem Klima einer bestimmten Gegend spricht, so versteht man darunter zumeist die allgemeinen, durch die geographische Lage bedingten klimatischen und meteorologischen Verhältnisse. Im besonderen wird jedoch das Klima für die einzelnen Örtlichkeiten dieser Gegend je nach Höhenlage, Hangverlauf, Bewaldung, Bestrahlung, bevorzugter Windrichtung usw. verschieden sein; so weicht das Klima im Tal von jenem auf der Höhe oder dem Hang eines Berges zumeist ab. Dieses Lokal- oder Standortsklima bezieht sich demnach nur auf einen kleinen Umkreis und wird daher auch als *Kleinklima* bezeichnet[1]. Die klimatischen und meteorologischen Unterschiede im Kleinklima wirken sich aber auch im Leben der Pflanzen- und Tiergesellschaften

[1] Vgl. *R. Geiger*, Handb. d. Klimatologie 1, Teil D, Berlin 1930.

aus, und daher kommt demselben für die Zusammensetzung des Edaphons eine besondere Bedeutung zu. Für das so definierte Kleinklima die Bezeichnung *Mikroklima* zu gebrauchen[1], halten wir für unzweckmäßig, möchten vielmehr diesen Ausdruck für das Klima mikroskopisch kleiner Siedlungsstätten reserviert wissen wie z. B. der Bodenhohlräume, deren Mikrobenbestände in neuester Zeit *Kubiena*[2] studiert hat.

B. Das Lunzer Gebiet und dessen Klima.

1. *Die kleinklimatischen Stationen.*

An der Grenze der niederösterreichischen Kalkvoralpen und Kalkhochalpen liegt in einer Höhe von 606 m über dem Meere der Lunzer Untersee mit der Biologischen Station *Seehof*, einer Stiftung des Dr. *Carl Kupelwieser*.

Gespeist wird der Untersee durch den Seebach, der das Wasser aus dem südlich vorgelagerten Dürensteinplateau (Gipfel 1880 m) herbeiführt und das in dieses tief eingeschnittene Hirschtal durchzieht, in dem sich auf zwei Talstufen der Mittersee (770 m) und der Obersee (1113 m) vorfinden.

Bedeutende Höhenunterschiede, vielfältige Bodengestaltung (Tal-, Paß- und Plateaulagen) sowie Abweichungen in der Gesteinsart (Dachsteinkalk bzw. Dolomit)[3] auf relativ engem Raum bedingen zusammen mit dem Vorhandensein der Station als Stützpunkt und Arbeitsstätte eine ausnehmend günstige Gelegenheit für die Ausführung bioklimatischer Untersuchungen. Um solche zu ermoglichen, wurden durch den Meteorologen *W. Schmidt* (Wien) in Gemeinschaft mit dem Leiter der Station, dem Hydrobiologen *F. Ruttner*, und unter Mitwirkung des Botanikers *H. Gams* (Innsbruck) in verschiedenen Lagen meteorologische Stationen errichtet, wobei die Wahl der Plätze vorwiegend nach pflanzengeographischen Gesichtspunkten erfolgte. Alle Stationen waren mit Thermohydrographen in einem Abstande von 130 cm von der Bodenoberfläche sowie einem Kontrollthermometer in gleicher Höhe, ferner mit Extremthermometern in 5, 30 und 100 cm *über* und in 5, 10 und 20 cm *in* dem Boden, zum Teil auch mit Regenmessern ausgerüstet und gegen Wild- und Weidevieheinbruch durch ein Stacheldrahtgitter gesichert. Sofern keine automatische Registrierung vorgesehen war, erfolgte die Ablesung der Instrumente allwöchentlich durch den Laboranten der Station (*S. Aigner*), eine im Hinblick auf das unwegsame Terrain mühevolle Arbeit.

Im nachstehenden sollen die einzelnen Stationen kurz charakterisiert werden, wobei die Reihung nach der Höhenlage erfolgt. Diese Angaben verdanken wir zum größten Teile dem Meteorologen *Schmidt* und dem Leiter der Station *Ruttner*, wofür beiden bestens gedankt sei.

[1] Vgl. *R. Geiger*, Handb. d. Klimatologie 1, Teil D, Berlin 1930. — [2] *W. Kubiena*, Arch. f. Pflanzenbau 5, 613, 1931; Biologia generalis 8, Lief. 2, 1932; diese Zeitschr. 8, 507—542, 1932. — [3] Eine umfassende geologisch-geographische Beschreibung des Gebietes liegt von *G. Götzinger* vor (Geomorphie der Lunzer Seen und ihres Gebietes, Intern. Rev. ges. Hydrobiol. u. Hydrographie, Suppl. 1 u. 2, 1912).

I. Mitterseeboden (770 m) (*Mn*).

Diese Station ist in einer Stufe des SN verlaufenden Hirschtales gelegen; der Untergrund besteht aus Bachschotter. Infolge geringer Sonnenscheindauer zeigen sich starke Temperaturschwankungen während des Tages mit einem spitzen Maximum sowie bedeutende Schwankungen der relativen Luftfeuchtigkeit von sehr geringen Werten zur Zeit des Temperaturmaximums bis zur nahezu vollständigen Sättigung in den letzten Nachtstunden. Infolge der stets feuchten, durch Pflanzenvegetation geschützten Oberfläche sind die Tagesschwankungen der Temperatur an jener gering.

Der Talboden, in dem die Station liegt, ist mit Hochstauden bewachsen: Dichte Bestände von *Petasites niveus*, *Cirsium oleraceum*, *Cirsium erisithales*, dazwischen *Senecio fuchsii* und andere Hochstauden.

Neben der gewöhnlichen Fauna der Hochstaudenfluren, wie eine solche auch auf *Schreier* zu finden ist, treten, durch das dichte Blätterdach begünstigt, auch extrem feuchtigkeitsliebende Tiere, wie *Vitrina elongata*, auf.

II. Schreier (780 m) (*Sr*).

Hangstation mit Ostexposition am Fuße einer Felswand auf steiler Schutthalde aus Dachsteinkalk. Geringe Bestrahlung infolge Beschattung und frühzeitigem Sonnenuntergang (bereits um Mittag). Daher allmählicher Anstieg der Temperatur bis zu einem Maximum um die Mittagsstunde mit plötzlichem Abfall; in den Nachmittagsstunden eine — wenn auch nicht so hoch reichende — Wärmewelle durch Fallwinde. Das Morgenmaximum ist wesentlich höher als in der Station *Mitterseeboden*; auch sind die Temperaturschwankungen infolge Gerölles stärker und dringen tiefer ein.

Hochstaudenflur mit *Corylus avellana* und *Rhamnus carthartica*, dazwischen viel *Eupatorium cannabinum*.

Die Station *Schreier* weist eine für die untere Waldstufe charakteristische Fauna auf, in der sich — trotz der begünstigten Hanglage der Station — nur wenige wärmeliebende Tiere vorfinden, so die thermophilen Baumwanzen *Lygaeus equestris* und *Corizus hyoscyami*[1].

III. Seekopfsattel (790 m) (*Sl*).

Schwach gegen SO geneigte Wiese in ausgesprochener Paßlage auf Lunzer Sandstein und Moränenschotter, einen großen Teil des Tages der Sonnenbestrahlung ausgesetzt. Lufttemperatur zwischen jenen von *Mitterseeboden* und *Schreier* liegend, Erwärmung durch Fallwinde, jedoch nicht mehr so ausgesprochen. Die Bodentemperatur schwankt zwischen denen der beiden genannten Stationen, die Tiefenwirkung jedoch ist gering.

Der Seekopfsattel beherbergt eine Anzahl wärmeliebender Tierarten der Vorberge, und zwar von Heuschrecken *Pholidoptera cinerea*, von Hemipteren *Corizus hyoscyami* usw. Charakterformen des Hochalpengebietes finden sich erst außerhalb der Station an den Nord- und Osthängen.

IV. Nos (1022 m) (*Ns*).

Auf einer steil nach Norden abfallenden Hangrippe in lichtem Walde auf Dolomit als Untergrund mit dicker Lage von Rohhumus darüber. Infolge ausgiebiger Abschirmung gegen die direkte Sonnenstrahlung außer-

[1] *W. Kühnelt*, Zoogeographica 1, 566—572, 1933.

ordentlich gleichmäßiger Verlauf der Temperatur; vor allem fehlt ein Abfall derselben durch nächtliche Abkühlung. Der Feuchtigkeitsgehalt ist infolge der großen Luftruhe verhältnismäßig hoch; nur durch die Föhnwirkung absteigender Luftströmungen kann eine stärkere Austrocknung eintreten. Auch im Boden sind die Temperaturschwankungen gering und erreichen nur bei Änderung des allgemeinen Witterungscharakters höhere Werte.

Die Vegetation besteht aus einer *Erica*heide mit *Ilex*, *Bergahorn* und *Krummholz*büschen. Um die Station findet sich lichter Mischwald aus *Fichte*, *Tanne* und *Rotföhre*. Vorherrschend sind *Pimpinella magna*, *Erica carnea* und *Scabiosa alpestris*; ferner wachsen hier die tropischen Familien angehörenden Moose *Hookeria* und *Brotherella*.

Die Station *Nos* ist außerordentlich arm an ständigen tierischen Bewohnern. Im Rohhumus *Oribatiden* und *Collembolen*.

V. Finstergstaud (1110 m) (*Fd*).

Schwacher Querriegel in steil abfallendem Tal; der Untergrund besteht aus Dolomit und Kalk. Durch die im SO und W überragenden Wände sowie durch Baumwuchs (*Fichten*bestand) beschattet; Exposition nur gegen NW. Daher Temperaturschwankungen sehr gering, vor allem im Boden. Infolge der windgeschützten Lage ändert sich auch der Feuchtigkeitsgehalt nur wenig.

Hochgrasige Wiese mit Hochstauden, wie *Senecio fuchsii* und viel *Trollius europaeus*; in der Umgebung *Fichten*wald.

VI. Gstettneralm (1270 m) (*Gm*).

In das Plateau eingesenkte Doline auf Dachsteinkalk, allseits von wesentlich überhöhenden Hängen umgeben, mit einem Grunddurchmesser von etwa 250 m; neben der Station ein Tümpel. Am Grunde der Doline bei schönem Wetter außerordentlich starke Temperaturschwankung mit Absinken bis zu einem nächtlichen Minimum. Die relative Feuchtigkeit macht die gegenläufigen Schwankungen durch, allerdings mit einer längeren Andauer voller Sättigung in der Nacht. Diese extremen Verhältnisse werden ganz wesentlich gefördert durch die windgeschützte Lage. Stärkere Temperaturschwankungen der Bodenoberfläche finden sich an den nicht durch Pflanzenwuchs geschützten Stellen, wenn auch wesentlich geringer als bei *Meisterau*.

Auf der sehr kurzrasigen Almweide ist unter anderem *Rumex alpinus* anzutreffen, an den Wänden der Doline *Krummholz*, erst weiter oben *Fichten*.

Zum ständigen Tierbestand gehören wenige Arten, die kälteresistent sind.

VII. Meisterau (1530 m) (*Mu*).

Schwach gegen S und SW geneigte Almwiese am höchsten Punkt eines Plateaus mit einzelnen Steinen und niedrigen Fichten; nördlich der Station ein Tümpel. Die vollkommen freie Lage bedingt geringe tägliche Schwankungen der Lufttemperatur und infolge der großen Windgeschwindigkeit stärkere Austrocknung des Bodens. Bei Änderungen des allgemeinen Witterungscharakters, z. B. bei Kälteeinbrüchen, folgt die Temperatur rasch. Auch tritt bei schlechtem Wetter, vor allem bei Nebel, vollständige Sättigung der Luft mit Wasserdampf ein; hingegen kann die relative

Feuchtigkeit zu Zeiten ansteigender Luftbewegung bis gegen 10 % sinken. Die Temperatur des Bodens an der Oberfläche schwankt ziemlich, auch bis in tiefere Schichten. Die Sonnenstrahlung macht sich fast ohne jede Schirmwirkung bis zum möglichen Maximum geltend. Die Station *Meisterau* beherbergt neben Charakterformen der hochalpinen Wiese eine Anzahl ausgesprochen thermophiler Tiere.

2. *Die meteorologischen Verhältnisse zur Zeit der Probenahme.*

Um ein ungefähres Bild von der allgemeinen Wetterlage zur Zeit der Probenahme zu geben, werden im Folgenden die meteorologischen Daten für die Monate August und September des Jahres 1930 mitgeteilt, die uns vom Meteorologen *W. Schmidt* freundlichst zur Verfügung gestellt wurden.

a) Temperatur und Niederschlagsmenge.

Die in Tabelle I niedergelegten Werte wurden — soweit sie die Temperatur betreffen — mit einem Maximum-Minimum-Thermometer ermittelt, und zwar einerseits in Luft in einer Höhe von 5 cm über der Bodenoberfläche und andererseits im Boden in 5 cm Tiefe; das beobachtete Minimum steht immer zuerst, ihm folgt — durch einen Strichpunkt getrennt — das Maximum. Die Niederschlagsmenge ist in Millimeter je Ablesungswoche angegeben. Alle Angaben sind Mittelwerte für die Ablesungswochen in den Monaten August und September 1933.

Tabelle I.

Station	Lufttemperatur °C	Bodentemperatur °C	Niederschlagsmenge mm
Mitterseeboden	4,1; 22,7	8,08: 14,28	53
Schreier	6,2; 30,0	11,0 ; 15,9	42,8
Seekopfsattel	5,3; 34,8	11,3 ; 20,8	48,3
Nos	4,7; 22,4	8,7 ; 14,4	51,5
Finstergstaud	5,1; 24,2	8,5 ; 17,2	57,4
Gstettneralm	— 2,1; 34,5	6,3 ; 16,7	57,5
Meisterau	1,9; 25,1	7,4 ; 16,8	55

Vergleicht man in Tabelle I die mittleren Schwankungen der Lufttemperatur innerhalb der neun Ablesewochen von Anfang August bis Ende September 1930 auf den einzelnen Stationen, so sind sie am geringsten (unter 20°) in *Nos*, *Finstergstaud* und *Mitterseeboden*, am extremsten auf der *Gstettneralm* (36,7°), während sich *Schreier*, *Seekopfsattel* und *Meisterau* in der Mitte halten (zwischen 20 und 30°). Besonders auffallend sind die starken Nachtfröste auf der *Gstettneralm*; diese Station zeigt auch die stärksten Schwankungen der Bodentemperatur, die am gleichförmigsten auf den Stationen *Schreier* und *Nos* ist.

b) Windverhältnisse.

Die Ermittlung derselben erfolgte mittels eines im Seelaboratorium (606 m) der Station *Seehof* untergebrachten registrierenden Schalenkreuz-Anemometers. Im allgemeinen war eine Zunahme der Häufigkeit des Windes von Morgen bis zu Mittag und eine Abnahme gegen Abend festzustellen. Der Durchschnitt der Windgeschwindigkeit während der Monate August und September 1930 betrug nach der *Beaufort*schen Skala 2, vorherrschend waren Winde aus NW.

c) Sonnenscheindauer und Bewölkung.

Diese sind als Tagesdurchschnitt in Stunden angegeben, und zwar als mittlere Werte für die Monate August und September 1930. Die Sonnenscheindauer wurde mittels des *Campbell-Stokes*schen Sonnenscheinautographen in der Station *Seehof* ermittelt.

Sonnenscheindauer: 4,8 Stunden. Absolute Bewolkung: 7,0 Stunden.

C. Die Probenahme.

Die Proben wurden an vier Stellen des eingezaunten Stationsbereiches entnommen, nachdem eine etwa 3 cm machtige Oberflachenschicht (Grasnarbe, Waldstreu) entfernt war, und zwar in der Regel aus einer Tiefe von 3 bis 7 cm (Bezeichnung „oben") und — sofern die ortlichen Verhältnisse es gestatteten — auch aus einer Tiefe von 8 bis 12 cm (Bezeichnung „unten"). Die Probenahme erfolgte mittels sterilen Stechers bzw. Löffels, und zwar

Tabelle II.

Nr.	Bodenprobe	Bezeichnung	Wassergehalt in g Wasser je 100 g	
			naturfeuchten Bodens	Bodentrockensubstanz
1	*Mitterseeboden*, oben . . .	*Mn*	48,6	94,6
2	„ unten . .	Mn_u	31,3	45,6
3	*Schreier*	*Sr*	70,3	236,7
4	*Seekopfsattel*, oben . . .	*Sl*	29,4	41,6
5	„ unten . . .	Sl_u	44,2	79,2
6	*Nos*	*Ns*	67,2	204,9
7	*Finstergstaud*	*Fd*	52,1	108,8
8	*Gstettneralm*, oben . .	*Gm*	56,2	128,3
9	„ unten . . .	Gm_u	64,1	178,6
10	*Meisterau*, oben	*Mu*	27,2	37,4
11	„ unten	Mu_u	27,2	37,4

ebenso wie die Aufbewahrung der Proben und die Herstellung eines Durchschnittes aus den vier Einzelproben unter sterilen Bedingungen. Nachdem die mikrobiologischen Versuche angesetzt waren, wurden die Böden lufttrocken gemacht, über einem 2-mm-Sieb von Steinen und groben Wurzelrückständen befreit und nach dieser Vorbereitung zur bodenkundlichen Untersuchung und für die Atmungsversuche verwendet.

Die untersuchten Bodenproben finden sich mit ihrem Wassergehalt in vorstehender Tabelle II verzeichnet.

D. Bodenkundliche Charakterisierung der untersuchten Bodenarten.

Zunächst handelte es sich darum, einen zahlenmäßigen Ausdruck für jene Bodeneigenschaften zu gewinnen, die für das Mikrobenleben von Bedeutung sind. Daneben war aber auch zu prüfen, inwieweit der Boden als Luft- und Wasserspeicher befähigt ist, die in zeitlichen Schwankungen unmittelbar einwirkenden Einflüsse des atmosphärischen Klimas auszugleichen. Die letzte Kennzeichnung sollte einigermaßen den Ersatz bilden für die leider fehlende Feststellung des „Bodenklimas".

Da infolge des verschiedenen Raumgehalts der einzelnen Bodenproben im Volumengewicht derselben beträchtliche Unterschiede bestehen, bieten die auf das Bodengewicht bezogenen Angaben keine brauchbare Vergleichsbasis, weshalb das spezifische Gewicht des Bodens bestimmt wurde, um so eine Umrechnung der Analysenergebnisse auf gleiche Bodenvolumina und hierdurch einen Vergleich der verschiedenen Bodenproben untereinander zu ermöglichen. Denn es ist wohl offenkundig, daß alle quantitativen Angaben betreffend die Lebensäußerungen der Mikroorganismen sich auf das gleiche Bodenvolumen als den wirksamen Lebensraum beziehen müssen, während das Bodengewicht ziemlich belanglos ist.

Die Tabelle III gibt Aufschluß über den *Kationenhaushalt* der Böden und ihren *Reaktionszustand*.

Spalte 1: Die *Sorptionskapazität T* gibt an, wieviel Milliäquivalente Kationen, einschließlich Wasserstoff, je 100 g bzw. je 100 ccm Boden in austauschfähiger Form vorliegen. Dieser Wert ergibt sich als Summe der Basensättigung und des Basendefizits.

Spalte 2: Die *Basensättigung S* gibt an, wieviel Milliäquivalente Kationen, ausschließlich Wasserstoff, je 100 g bzw. je 100 ccm Boden in austauschfähiger Form vorliegen. Bestimmung nach *H. Kappen*[1].

Spalte 3: Das *Basendefizit T-S* gibt an, wieviel Milliäquivalente Wasserstoffionen je 100 g bzw. 100 ccm Boden in austauschfähiger Form vorliegen. Bestimmung durch elektrometrische Titration.

Spalte 4: *Sättigungsgrad V* kennzeichnet den Gehalt an austauschfähigen Basen in Prozenten der Sorptionskapazität, d. h. den Grad der Entbasung oder der Basenanreicherung und damit auch die Bodenreaktion.

Spalte 5: Die *Basenreserve* gibt an, wieviel Milliäquivalente Basen neben den austauschfähigen Basen in Form von Carbonaten vorliegen; dieser Wert ergibt sich aus der Bestimmung des Carbonatgehaltes der Böden.

Spalte 6: Die *Bodenreaktion* ist durch den auf elektrometrischem Wege mit der Chinhydronelektrode ermittelten p_H-Wert angegeben.

Spalte 7 und 8: Die *Pufferung* der Böden ist durch die Menge H- und OH-Ionen gekennzeichnet, die eine Verschiebung des p_H-Wertes um eine Einheit bedingen. Die Bestimmung erfolgte durch elektrometrische Titration.

[1] *H. Kappen*, Die Bodenazidität, S. 169. Berlin 1929.

Tabelle III.

Bezeichnung	Stationen	1	2	3	4	5	6	7	8
		Bau der Sorptionskomplexe				Basenreserve (Carbonatbasen) in Milliäquiv. je 100 g (Milliäquiv. je 100 ccm)	p_H	Pufferung pro p_H und 100 g Boden (100 ccm)	
		Sorptionskapazität T	Basensättigung S	Basendefizit $T - S$	Sättigungsgrad $V = \frac{100\,S}{T}$			Milliäquiv. H'-Ion	Milliäquiv. OH'-Ion
		in Milliäquivalenten je 100 g (je 100 ccm)							
Mn	*Mitterseeboden*, oben	56,6 (42,0)	53,8 (39,9)	2,8 (2,1)	95,0	1041,2 (771,0)	7,7	14,6 (10,8)	3,6 (2,8)
Mn$_u$	" unten	58,0 (43,3)	56,0 (41,8)	2,0 (1,5)	96,2	1017,0 (760,0)	7,8	14,0 (10,4)	3,4 (2,5)
Sr	*Schreier*	65,2 (41,0)	57,6 (36,0)	7,6 (5,0)	88,0	254,4 (158,2)	7,4	19,5 (12,2)	7,0 (4,4)
Sl	*Seekopfsattel*, oben	53,5 (50,0)	45,5 (42,5)	8,0 (7,5)	84,8	keine	6,4	3,5 (3,3)	2,8 (2,6)
Sl$_u$	" unten	51,7 (48,5)	46,5 (43,6)	5,2 (4,9)	89,9	"	6,5	1,6 (1,5)	1,0 (0,9)
Ns	*Nos*	59,2 (31,7)	51,2 (27,5)	7,4 (4,2)	86,2	178,6 (95,5)	7,4	34,5 (18,4)	7,4 (4,0)
Fd	*Finstergstaud*	64,4 (36,6)	56,4 (32,1)	8,0 (4,5)	87,7	355,2 (202,0)	7,5	36,2 (20,6)	7,4 (4,2)
Gm	*Gstettneralm*, oben	44,1 (35,6)	22,5 (18,2)	21,6 (17,4)	50,8	keine	4,7	2,5 (2,0)	2,4 (1,9)
Gm$_u$	" unten	25,2 (27,5)	15,0 (16,4)	10,2 (11,1)	59,5	"	5,4	1,4 (1,5)	1,1 (1,2)
Mu	*Meisterau*, oben	53,2 (35,5)	31,0 (20,6)	22,2 (14,9)	58,0	"	5,1	4,2 (2,8)	6,4 (4,3)
Mu$_u$	" unten	31,4 (34,3)	18,0 (19,6)	13,4 (14,7)	57,2	"	5,0	1,8 (2,0)	2,0 (2,2)

Tabelle IV.

Bezeichnung	Stationen	Ca-Gehalt	Mg-Gehalt	Verhältnis Ca/Mg
		in Milliäquiv. je 100 g (je 100 ccm)		
Mn	*Mitterseeboden*, oben	690,8 (552,0)	404,2 (300,0)	1,71
Mn$_u$	" unten	681,0 (510,0)	392,0 (292,0)	1,74
Sr	*Schreier*	256,4 (160,0)	55,6 (34,7)	4,60
Sl	*Seekopfsattel*, oben	42,6 (39,9)	2,1 (2,0)	20,3
Sl$_u$	" unten	44,7 (42,0)	1,8 (1,7)	24,8
Ns	*Nos*	175,8 (93,5)	54,0 (28,9)	3,2
Fd	*Finstergstaud*	300,0 (170,2)	111,6 (63,0)	2,7
Gm	*Gstettneralm*, oben	22,6 (18,2)	0,5 (0,43)	45,1
Gm$_u$	" unten	14,8 (15,2)	0,35 (0,38)	42,0
Mu	*Meisterau*, oben	26,1 (17,4)	4,5 (3,0)	57,9
Mu$_u$	" unten	15,0 (16,4)	2,4 (2,6)	62,3

Die Tabelle IV enthält den Ca- und Mg-Gehalt der Böden und das daraus sich ergebende Ca/Mg-Verhältnis.

Auf Grund dieser Untersuchungen ordnen sich die Stationen in drei Gruppen:

I. Sorptionskomplex basengesättigt und außerdem Basenreserven, daher alkalische Reaktion (*Mitterseeboden*, *Schreier*, *Nos*, *Finstergstaud*).

II. Sorptionskomplex noch weitgehend basengesättigt, aber keine Basenreserve; schwach saure Reaktion (*Seekopfsattel*).

III. Basendefizit im Sorptionskomplex; saure Reaktion (*Gstettneralm* und *Meisterau*).

Die Böden sind demnach um so weitgehender entbast, je höher die Station gelegen ist. Eine Sonderstellung nehmen die Stationen *Nos* und *Finstergstaud* ein, die trotz ihrer bedeutenden Höhenlage über beträchtliche Basenreserven verfügen, in denen jedoch das Mg in den Vordergrund tritt und eine Basennachlieferung aus der dolomitischen Unterlage wahrscheinlich macht. Die Sonderstellung der beiden Stationsböden ist auch an ihrem hohen Pufferungsvermögen zu erkennen.

In der Tabelle V finden sich die folgenden Angaben:

Spalte 1: Gehalt an *organischer Substanz*; Bestimmung durch nasse Verbrennung nach *Knop*[1].

Spalte 2: *Volumgewicht des Bodens*; orientierende Bestimmung durch Einrütteln in ein Meßgefäß.

Spalte 3: *Volumgewicht der festen Bodensubstanz*; Bestimmung nach *Albert* und *Bogs*[2].

Spalte 4: *Porenvolumen*; errechnet aus den Werten der Spalten 2 und 3.

Spalte 5: *Wasserkapazität WK* in Volum- und Gewichtsprozenten.

Spalte 6: *Kritischer Wassergehalt k*, d. h. die Nutzbarkeitsgrenze des Wassers für die höhere Pflanze; Bestimmung nach *Sekera*[3].

Spalte 7: *Gebundenes Wasser H* als Nutzbarkeitsgrenze des Wassers für die Mikroorganismen; Bestimmung durch Trocknen des Bodens über 10%iger Schwefelsäure.

Spalte 8: *Träg bewegliches Bodenwasser k-H* ergibt sich als Differenz von Spalte 6 und 7.

Spalte 9: *Frei bewegliches Bodenwasser WK-k* ergibt sich als Differenz von Spalte 5 und 6.

Spalte 10: *Luftkapazität*; wird berechnet als Differenz von Spalte 4 und 5.

[1] Vgl. *F. Wahnschaffe* u. *F. Schucht*, Wissenschaftl. Bodenunters., 4. Aufl., S. 66. Berlin 1924. — [2] *L. Albert* u. *O. Bogs*, Int. Mitt. Bodenkde. 4, 1914. — [3] *F. Sekera*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkde., Teil A, **26**, 102, 1932.

Tabelle V.

Bezeichnung	Stationen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
						Wasser- und Lufthaushalt					
		Organische Substanz Gew.-%	Volumgewicht des Bodens	Volumgewicht der festen Substanz	Porenvolumen	Wasserkapazität WK	kritischer Wassergehalt k	gebundenes Wasser H	träges Wasser k-H	bewegliches Wasser WK-k	Luftkapazität
					%	in Vol.-% (Gew.-%)					
Mn	*Mitterseeboden*, oben	23.8	0,740	2.35	68,4	44,8 (60,3)	24,6	8,0	16,6	20,2	23,7
Mn$_u$	„ unten	24,8	0,745	2,17	66.7	43.7 (58,5)	24.8	8,1	16,7	18,9	23,0
Sr	*Schreier*	41.4	0,624	1,71	63,6	54.1 (86,7)	47,8	12.4	35,4	6,3	9,5
Se	*Seekopfsattel*, oben	25,0	0,932	2,12	56,0	41,6 (44,4)	31,6	8,9	22,7	10,0	14,4
Sl$_u$	„ unten	23,0	0,938	2,17	56,8	42,0 (44.6)	29,0	8,7	20,3	13,0	14,8
Ns	*Nos*	36,1	0,533	1.91	72,2	42,6 (79.6)	31,5	9,4	22,1	11,1	29,6
Fd	*Finstergstaud*	44,5	0,568	1,67	66,2	44,0 (77,5)	38,0	11,4	26,6	6,0	22,2
Gm	*Gstettneralm*, oben	26,7	0,805	2,22	65,9	48,5 (60,0)	40,4	9,5	30,9	8,1	17,4
Gm$_u$	„ unten	12,5	1,085	2.42	55,1	49,0 (44,9)	25,3	7,9	17,4	23,7	6,1
Mu	*Meisterau*, oben	38,5	0,665	1,85	64.2	48.2 (72.5)	45.1	10,0	35,1	3,1	16,0
Mu$_u$	„ unten	11,0	1,085	2,43	55,3	42,4 (39,8)	33,5	8,6	24,9	9,9	12,9

Im Rahmen des Wasserhaushaltes kann dem *kritischen Wassergehalt* des Bodens insofern Bedeutung zukommen, als die Wasserzirkulation im Boden und zwangsläufig auch der Luftaustausch um so träger sich vollzieht, je höher der kritische Wassergehalt liegt. Der Zu- und Abtransport der Nährstoffe und Stoffwechselprodukte ist demnach an diese Voraussetzungen gebunden, aber es erscheint fraglich, ob die im Wasser- und Lufthaushalt erkannten Unterschiede sich im Mikrobenleben auswirken können, da die Lunzer Böden infolge des Niederschlagreichtums und der felsigen Unterlage vorwiegend mit Wasser übersättigt sind, wodurch die gegebenen Unterschiede sich ausgleichen.

E. Die mikrobiologische Untersuchung.

Die mikrobiologische Untersuchung erstreckte sich auf die quantitative und qualitative Ermittlung a) der kollektiven *Bakterienflora*, b) der elektiven *Bakterienarten*, c) der *Actinomyceten*, d) der *Schimmelpilze*, e) der *Sproßpilze* sowie f) auf die Bestimmung der Bodenatmung.

1. Die Keimzahlbestimmung.

Für die Ermittlung der Gesamtkeimzahl an Bakterien, Actinomyceten, Sproß- und Schimmelpilzen stehen im allgemeinen zwei Gruppen von Verfahren zur Verfügung, die direkte mikroskopische Auszählung und die Plattenmethode.

Der *direkten mikroskopischen Auszählung* des gefarbten Praparates haftet schon in quantitativer Hinsicht der Nachteil an, daß infolge der Mitzählung toter Zellen und der schwierigen Unterscheidbarkeit der Bakterien von manchen unbelebten Bestandteilen zu hohe Werte erhalten werden. In qualitativer Hinsicht sind die Ergebnisse dieser Methode noch ungünstigere, da sie bezüglich der Artenfrage ganz unzulangliche Angaben liefert. Ihr Wert liegt jedoch zweifelsohne darin, daß sie über den Zustand Aufschluß gibt, in dem sich die Mikroben im Boden vorfinden, so bei Bakterien, ob als vegetative Zellen oder Sporen, bei Schimmelpilzen, ob als Mycelstück oder als Vermehrungszelle.

Die *Plattenmethode*, bei der die Feststellung des Keimgehaltes aus der Zahl der Kolonien erfolgt, bietet den Vorteil, daß die toten Zellen nicht mitgezählt werden, weist jedoch den Mangel auf, daß meist ein künstliches Nährsubstrat verwendet wird, in dem nur ein Bruchteil der im Boden vorhandenen entwicklungsfähigen Keime zur Vermehrung kommt. Man gibt daher aus diesem Grunde sowie wegen der leichteren Unterscheidbarkeit der Kolonien der einzelnen Bakterienarten voneinander vielfach den aus Bodenextrakt bereiteten Nährböden vor rein synthetischen den Vorzug. Da jedoch zwischen den einzelnen Bodenarten bedeutende Unterschiede in der Zusammensetzung bestehen, bietet auch ein Bodenextraktnährboden nicht die optimalen Entwicklungsbedingungen für die Mikroflora des Versuchsbodens; zudem ist ein solcher Nährboden infolge seiner schwankenden Zusammensetzung nicht reproduzierbar. Es ist daher auch empfohlen worden, den Versuchsboden *selbst* für die Herstellung des

Bodenextraktes zu benutzen; dagegen ist jedoch zu bedenken, daß gerade hierdurch die im Boden vorherrschenden Mikroorganismen in ihrer Entwicklung besonders begünstigt, die übrigen aber zurückgehalten werden dürften, so daß die Gefahr besteht, daß die in geringer Zahl im Boden sich vorfindenden Bakterienarten überhaupt nicht zur Isolierung kommen. Es werden ferner dadurch vergleichende Bodenuntersuchungen ungemein erschwert, weshalb wir für unsere Forschungen synthetischen Nährböden den Vorzug gaben.

Wir verwendeten zur Isolierung der Bakterien den Asparagin-Mannitagar nach *Thornton* in der folgenden abgeänderten Zusammensetzung: m/200 KNO_3, m/200 KH_2PO_4, m/1000 $MgSO_4$, m/1000 $CaCl_2$, m/500 NaCl, 10^{-5} mol. $FeCl_3$, m/200 Asparagin, m/200 Mannit, $1^1/_2$ % Agar. Die Bestandteile wurden bis auf den Mannit in destilliertem Wasser gelöst, dann Agar zugegeben, filtriert und nach dem Hinzufügen des Mannits auf das entsprechende Volumen (meist 1000 ccm) aufgefüllt; die Einstellung der Reaktion auf $p_H = 7{,}4$ erfolgte mittels n/10 Natronlauge.

Zur quantitativen Ermittlung der Schimmelpilze, Hefen und Actinomyceten diente der von *Waksman* angegebene und von uns etwas modifizierte Glucose-Peptonnährboden: m/20 Glucose, m/100 KH_2PO_4, m/500 $MgSO_4$, 0,5 % Pepton, 2,5 % Agar; durch Zugabe von n H_2SO_4 wurde auf $p_H = 4$ eingestellt.

Bei allen Keimzahlbestimmungen wurden zunächst 10 g der Bodenprobe in 1 Liter sterilen Leitungswassers gleichmäßig verteilt und nun immer weitere Verdünnungen im Verhältnis 1 : 10 vorgenommen. Für die Beimpfung der Plattenkulturen kamen dann die Verdünnungen $1:10^4$ und $1:10^5$, die also die Keime von 1 g Erde in 10 bzw. 100 Liter Wasser enthielten, zur Verwendung. Von beiden Verdünnungen stellten wir je zehn *Petri*schalen-Kulturen her, um eine Zuverlässigkeit des Zählergebnisses von 5 bis 6 % zu erreichen[1].

Die erhaltenen Keimzahlen finden sich in Tabelle VI in Tausenden Keimen verzeichnet, daher sind die daselbst angegebenen Werte mit 10^3 zu multiplizieren; hierzu muß jedoch bemerkt werden, daß diese Keimzahlen bei Schimmelpilzen und Actinomyceten nichts über die Zahl an physiologisch tätigen Individuen, sondern bloß etwas über die Reichhaltigkeit der Fruktifikation aussagen.

Eine vergleichende Gegenüberstellung der in Tabelle VI enthaltenen Werte mit den Ergebnissen der bodenkundlichen Analyse läßt weder bezüglich der Gesamtkeimzahl noch betreffend den Gehalt an Vertretern der einzelnen Mikrobengruppen (Bakterien, Actinomyceten, Sproß- und Schimmelpilzen) irgendwelche augenfällige Beziehungen erkennen. Der Grund hierfür ist offenbar in dem Umstande zu suchen, daß keiner der wirksamen Umweltfaktoren genügend dominiert, um auf das biologische Geschehen im Boden einen beherrschenden Einfluß auszuüben, vielmehr Art und Zahl der Keime von einer Mannigfaltigkeit von Faktoren abhängen, deren Wirkungsintensität ungefähr

[1] Vgl. *A. Janke* u. *H. Zikes*, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, Dresden 1928, S. 77.

Tabelle VI[1].

Keimzahl in Tausenden Keimen.

Bodenprobe:	Mn	Mn_u	Sr	Sl	Sl_u	Ns	Fd	Gm	Gm_u	Mu	Mu_u
a) Je 1 g Boden-Trockensubstanz.											
Bakterien . .	781440	282930	58587	72139	52075	12379	237090	490940	14690	781160	10322
Actinomyceten	27777	18052	19342	23	—	15	286390	15474	7184	21595	17875
Schimmelpilze	7835	1728	1846	1731	1128	894	1760	1120	1117	8060	1613
Sproßpilze . .	997	640	80	65	52	603	1291	129	1147	431	645
Gesamt . . .	818049	303350	79855	73958	53255	13891	526531	507663	24138	811246	30455
b) Je 1 ccm Boden-Trockensubstanz.											
Bakterien . .	1836400	613960	100190	152940	112990	23644	395940	1081900	35469	1445100	25083
Actinomyceten	65277	40970	33075	49	—	29	478280	34353	17345	39950	43420
Schimmelpilze	18389	6487	3157	3670	2448	1708	2939	2486	2460	14911	3920
Sproßpilze . .	2344	1389	137	137	113	1152	2156	286	2769	797	1568
Gesamt . . .	1922410	662806	136559	156796	115551	26533	879315	1127025	58043	1500758	73991

[1] Die in den Tabellen VI, VIII und IX enthaltenen Keimzahlen nehmen auf die Trockensubstanz der Bodenaufschlämmung Bezug, die durch ein 2-mm-Sieb von den groberen Bestandteilen (Steinen, Wurzelwerk usw.) befreit worden war, denn nur so konnte die Berechnung auf die Volumeneinheit durchgeführt werden; hierdurch erklären sich auch die relativ hohen Keimzahlen. Will man die Anzahl Keime je 1 g Trockensubstanz der ursprünglichen Bodenproben ermitteln, so kann dies geschehen durch Multiplikation der in den Tabellen VI (a) und VIII enthaltenen Werte mit nachfolgenden Faktoren: Mn 0,153; Mn_u 0,252; Sr 0,481; Sl 0,4; Sl_u 0,349; Ns 0,910; Fd 0,202; Gm 0,630; Gm_u 0,277; Mu 0,223; Mu_u 0,147.

Mittels der in Tabelle II enthaltenen Wassergehalte lassen sich dann auch die auf 1 g der naturfeuchten Böden bezogenen Keimgehalte berechnen.

gleich stark ist. Die besonders auffallende Tatsache, daß Böden, die in ihren Eigenschaften ziemlich weitgehend übereinstimmen und aus klimatisch ähnlichen Lagen stammen, wie die Bodenproben von *Nos* und *Finstergstaud*, einen ganz bedeutenden Unterschied im Keimgehalt aufweisen, dürfte auf die unterschiedliche Pflanzendecke zurückzuführen sein.

Das durch andere Forscher beobachtete gehäufte Auftreten von Schimmelpilzen mit abnehmendem p_H war wohl in der Bodenprobe *Mu* (*Meisterau*), keineswegs aber allgemein wahrzunehmen. Auch ließ sich eine Korrelation zwischen dem Keimzahlverhältnis von Schimmelpilzen zu Bakterien + Actinomyceten und dem Wasserstoffexponenten nach *Jensen*[1] nicht feststellen, was jedoch nicht wundernehmen kann, da es doch schwerlich angängig ist, eine Beziehung herzustellen zwischen dem die Individuenzahl angebenden Keimgehalt an Bakterien und dem die Üppigkeit der Fruktifikation bzw. den Zerfall des Mycels in Hyphenteile zum Ausdruck bringenden Keimgehalt an Schimmelpilzen und Actinomyceten.

Der Wasser- und Lufthaushalt der — im lufttrockenen Zustande untersuchten — Böden scheint auf deren Mikrobenbestand ohne Einfluß zu sein, was offenbar damit zusammenhängt, daß die meisten Böden infolge des großen Niederschlagreichtums des Lunzer Gebietes zur Zeit der Probenahme mit Wasser stark übersättigt waren.

2. Die quantitative Ermittlung der physiologischen Bakteriengruppen.

Jene Bakterienarten, denen eine bestimmte physiologische Leistung zukommt, können mittels eines Verdünnungsverfahrens unter Verwendung elektiver Nährböden ihrer Zahl nach ermittelt werden, indem man die Verdünnung der Probe soweit treibt, bis nach Aussaat gleicher Volumenteile der Grenzverdünnung in den elektiven Nährboden zum Teil Entwicklung eintritt, zum Teil aber nicht.

Die praktische Ausführung dieser Methode erfolgt als *Unterteilungsverfahren*[2] derart, daß man ein bestimmtes Volumen V der entsprechend verdünnten Keimsuspension auf x Teile aufteilt und je V/x ccm in $x—1$ Kölbchen oder Eprouvetten, die mit dem betreffenden elektiven Nährboden gefüllt sind, einbringt, die letzten V/x ccm aber wieder auf x Teile aufteilt, so daß demnach jedes Gefäß der zweiten Reihe V/x^2 ccm der ursprünglichen Probe bzw. Ausgangsverdünnung enthält. Diese Unterteilung wird zumeist noch ein drittes Mal vorgenommen, indem man die letzten V/x^2 ccm wieder auf x Gefäße verteilt. Das Wesen dieses Unterteilungsverfahrens besteht darin, daß das Glied jeder Reihe soviel von der

[1] *H. L. Jensen*, Soil Science 31, 123—158, 1931. — [2] Vgl. *A. Janke* u. *H. Zikes*, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie, S. 80. Dresden 1928.

Probe enthält als sämtliche Glieder aller folgenden Reihen zusammengenommen. Arbeitet man mit drei Reihen, so ist demnach

$$V/x = (x - 1) \,.\, V/x^2 + x \,.\, V/x^3.$$

In vorliegender Arbeit kam das Unterteilungsverfahren als *Zehntelungsverfahren* in Anwendung, das für die Bestimmung des sogenannten *Coli*titers im Trinkwasser durch *Schütz*[1] angegeben, durch *Krombholz* und *Lorenz*[2] aber variationsstatistisch ausgewertet wurde. Bei dieser Methode beträgt also $x = 10$, d. h. jede Reihe umfaßt neun Glieder, nur die letzte deren zehn. Die Ausführung gestaltete sich in unseren Versuchen wie folgt.

Es wurden jeweils 30 Reagensgläser mit je 9 ccm des betreffenden elektiven Nährbodens gefüllt und sterilisiert. In jedes der zehn Röhrchen der ersten Reihe brachten wir dann je 1 ccm der für die Keimzahlbestimmung benutzten Verdünnung der Probe 1 : 100. Die im letzten Röhrchen so erhaltenen 10 ccm wurden nach guter Mischung auf die zehn Röhrchen der zweiten Reihe zu je 1 ccm aufgeteilt und der gleiche Vorgang bei der dritten Reihe wiederholt, so daß der Grad der Verdünnung auf die Probe bezogen betrug: bei der ersten Reihe $1 : 10^2$, bei der zweiten Reihe $1 : 10^3$ und bei der dritten Reihe $1 : 10^4$.

Nach 8 bis 14 Tagen erfolgte die Feststellung des Röhrchens mit der geringsten Verdünnung, in dem Entwicklung ausgeblieben war. Die Reihe, in dem sich dieses Röhrchen vorfindet, wird der Berechnung zugrunde gelegt, und zwar muß das Verhältnis der positiven Röhrchen dieser Reihe zu den negativen festgestellt werden, wobei die nachfolgende Reihe an Stelle eines positiven Gliedes der vorhergehenden gerechnet wird, sofern auch nur in einem ihrer Röhrchen Entwicklung eingetreten ist. Hat man die Zahl der positiven Glieder in der fraglichen Reihe ermittelt, so kann man aus der von *Krombholz* und *Lorenz*[2] angegebenen Tabelle VII die wahrscheinlichste Keimzahl und die Abweichungen von dieser nach oben und unten entnehmen, worauf die erhaltenen Werte nur noch mit dem Verdünnungsgrad zu multiplizieren sind.

Tabelle VII.

Untersuchungsergebnis:		1 : 10	2 : 10	3 : 10	4 : 10	5 : 10	6 : 10	7 : 10	8 : 10	9 : 10
Wahrscheinlichste Keimzahl		1	2	3	5	6	8	11	15	22
Mit 95% Wahrscheinlichkeit beträgt die Keimzahl	nicht weniger	1	2	3	4	5	6	7	8	10
	nicht mehr	2	3	5	8	11	15	20	30	49
	demnach	1^{+1}_{-0}	2^{+1}_{-0}	3^{+2}_{-0}	5^{+3}_{-1}	6^{+5}_{-1}	8^{+7}_{-2}	11^{+9}_{-4}	15^{+15}_{-7}	22^{+27}_{-12}

Die vielfach übliche[3] Ausführung des Zehntelungsverfahrens mit Anstellung von bloß einem Röhrchen auf jeder Verdünnungsstufe, wobei die geringste Verdünnung, in der noch eine Entwicklung der Mikroorganismen eingetreten oder deren chemische Umsetzung noch nachweisbar ist, der

[1] *Schütz*, Zeitschr. f. Hyg. **80**, 280. — [2] *E. Krombholz* u. *W. Lorenz*, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Beih. zu **104**, 277, 1927. — [3] Z. B. *D. Fehér*, Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens, S. 13. Berlin 1933.

Ermittlung der Keimzahl zugrunde gelegt wird, indem der Verdünnungsgrad dieses Röhrchens direkt den Keimgehalt angibt, ist mit einem mehrhundertprozentigen Fehler behaftet und daher nicht zu empfehlen.

Die quantitativen Ermittlungen an physiologischen Bakteriengruppen wurden ausgedehnt auf *Nitrifikanten*, *Denitrifikanten*, *aerobe Stickstoffbinder* (*Azotobacter*), *Amylobacter* und *Anaerobier*.

Die hierzu verwendeten Nährlösungen waren die folgenden:

Für *Nitrifikanten* nach *Waksman*, wie folgt modifiziert: m/100 $Mg(NH_4)PO_4$, m/100 KH_2PO_4, m/100 $MgSO_4$, m/50 NaCl, m/100 $FeSO_4$, m/20 $MgCO_3$.

Für *Denitrifikanten* nach *Giltay* in folgender Abänderung: m/50 $NaNO_3$, m/100 K_2HPO_4, m/200 $MgSO_4$, m/20 Na-Citrat, m/1000 $CaCl_2$, 10^{-5}.m/2 $FeCl_3$.

Für *Azotobacter* nach *Waksman*, wie folgt modifiziert: m/50 KH_2PO_4, m/1000 $MgSO_4$, m/1000 $CaCl_2$, 10^{-5}.mol. $FeCl_3$, m/100 Mannit, mittels n NaOH auf $p_H = 7{,}6$ eingestellt.

Für *Amylobacter* nach *Winogradsky*:

Glucose	2 g	$FeSO_4 . 7 H_2O$.	0,001 g
K_2HPO_4	0,1 g	$MnSO_4 . 4 H_2O$.	0,001 g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0,02 g	Kreide	10 g
NaCl	0,001 g	H_2O . . .	auf 100 ccm

Für *Anaerobier* Nahrbouillon mit Hühnerleber: Die mittels N-Sodalosung auf $p_H = 7{,}2$ bis 7,4 eingestellte Nährbouillon (mit 1% Pepton und ½% NaCl) erhielt vor dem Sterilisieren je Rohrchen einen Zusatz von etwa 1 g Hühnerleber, der eine reduzierende und nahrende Wirkung zukommt.

Die Ergebnisse des Zehntelungsverfahrens finden sich in den Tabellen VIII und IX zusammengestellt, wobei die Zahlen in Kleindruck die Schwankungen des Mittelwertes nach oben bzw. unten bedeuten; fehlt die eine oder andere, so soll dies besagen, daß eine Schwankung nach der betreffenden Seite unwahrscheinlich ist. Das Zeichen $>$ gibt an, daß die Keimzahl sicher uber dem angeführten Zahlenwert liegt. Die Tabellen VIII und IX liefern im Gegensatz zur Tabelle VI unmittelbar den Keimgehalt.

Aus den Angaben der nachstehenden Tabellen ist vor allem das Auftreten der *aeroben Stickstoffbinder* (*Azotobacter*) selbst in einem Boden von einem Wasserstoffexponenten von 5 und weniger (4,7) hervorzuheben, was mit den Feststellungen anderer Forscher[1] im Einklang steht, wonach die *Azotobacter*-Arten im Waldboden sich wesentlich niedrigeren p_H-Werten angepaßt haben als dies im Ackerboden der Fall ist. Auffällig ist jedoch andererseits das spärliche Auftreten bzw. vollständige Fehlen von *Azotobacter* in den Erdproben Mn_u, *Ns* und *Fd*, wofür vielleicht das enge Ca/Mg-Verhältnis dieser Böden verantwortlich zu machen ist.

[1] Siehe Fußnote [3] auf voriger Seite.

Tabelle VIII[1].

Keimgehalt, bezogen auf 1 g Bodentrockensubstanz

Stationen	*Nitrifikanten*		*Denitrifikanten*		*Aerobe N-Binder*		*Amylobacter*		*Anaerobier*	
Mn	15 669	34 899 7 121	6 410	11 395 4 985	2 136	3 561	641 020	1 109 520 498 570	156 690	348 990 71 280
Mn_u	19 203	35 206 16 003	1 920	3 520 1 600	< 320	640	192 035	352 065 160 030	160 030	256 047 127 924
Sr	2 467	4 413 2 367	36 115	64 205 35 007	3 611	6 420 3 500	36 115	64 205 35 007	240 770	441 320 236 757
Sl	9 791	17 950 8 159	17 915	32 637 11 422	48 955	81 592	17 950	32 637 11 422	17 950	32 637 11 422
Sl_u	43 039	64 568	> 1 054 250		3 227	6 454 1 721	> 1 054 250		19 363	34 423 15 060
Ns	3 333	7 423 1 515	2 272	4 545 1 212	303	454	333 330	742 340 151 510	33 333	74 234 15 151
Fd	176 055	293 425	117 365	176 050	0		880 280	1 760 550 469 480	64 653	117 470 41 179
Gm	323 270	646 540 172 410	43 103	64 655	5 819	10 570 2 155	2 155	4 310	58 190	105 700 21 551
Gm_u	6 640	14 790 3 018	6 037	9 055	3 320	6 036 2 112	2 716	4 829 2 112	6 640	14 790 3 018
Mu	107 760	172 414 86 208	32 327	64 654 15 086	1 077	1 724 862	323 270	646 540 150 860	> 1 056 030	
Mu_u	6 043	9 064	6 646	14 083 3 021	4 531	9 063 2 416	1 510	2 416 1 208	332 320	604 220 211 475

[1] Vgl. die Fußnote zu Tabelle VI.

Tabelle IX[1].

Keimgehalt, bezogen auf 1 ccm Bodentrockensubstanz.

Stationen	*Nitrifikanten*		*Denitrifikanten*		*Aerobe N-Binder*		*Amylobacter*		*Anaerobier*	
Mn	36 823	82 014 / 16 734	15 040	11 715	5 019	8 368	1 506 400	1 171 600	368 230	820 140 / 167 510
Mn_u	41 671	76 406 / 34 727	4 166	7 638 / 3 472	< 695	1 389	416 730	764 000 / 347 270	347 270	555 650 / 277 570
Sr	4 219	7 546 / 4 048	61 757	109 790 / 59 860	6 176	10 979 / 5 986	61 757	109 790 / 59 860	421 900	754 600 / 404 800
Sl	20 760	38 054 / 17 298	38 054	69 020 / 24 216	103 785	172 980	38 054	69 020 / 24 216	38 054	69 020 / 24 216
Sl_u	93 394	140 110	> 2 289 300		7 002	14 005 / 3 735	> 2 289 300		42 018	70 820 / 24 792
Ns	6 360	14 173 / 2 894	4 339	8 681 / 2 315	867	579	636 600	1 417 300 / 289 400	63 660	14 730 / 28 940
Fd	294 090	490 040	196 010	294 000	0		1 470 000	2 490 900 / 783 900	108 215	176 230 / 21 747
Gm	717 730	1 430 250 / 382 730	956 900	1 435 400	12 918	23 465 / 4 784	4 784	9 568	129 180	234 650 / 47 840
Gm_u	16 032	35 710 / 7 287	14 586	21 863	8 016	14 573 / 5 099	6 557	11 659 / 5 099	16 032	35 710 / 7 287
Mu	199 430	318 940 / 15 949	59 810	119 600 / 27 916	1 993	3 189 / 1 594	598 100	1 196 000 / 279 160	> 1 954 000	
Mu_u	14 684	22 026	15 782	34 215 / 6 248	11 010	22 023 / 5 871	3 669	5 871 / 2 937	807 500	1 468 200 / 513 950

[1] Vgl. die Fußnote zu Tabelle VI.

Im allgemeinen waren *Amylobacter*-Arten reichlicher anzutreffen als aerobe Stickstoffbinder, was mit den Feststellungen von *Amberg*[1] betreffend die Bakterienflora am Pilatus in der Schweiz im Einklang steht.

Ebenso wie der Mikrobenbestand im allgemeinen, so scheint auch der Gehalt an physiologischen Bakteriengruppen zu dem Wasser- und Lufthaushalt der (lufttrockenen) Böden wegen deren starker Übersättigung mit Wasser zur Zeit der Probenahme in keiner eindeutigen Beziehung zu stehen; Näheres hierüber bringt der II. Teil.

3. *Die Bestimmung der Bodenatmung.*

Zur Bestimmung der Bodenatmung, d. h. der von den Bodenmikroben produzierten Atmungskohlensäure, diente die in Abb. 1 skizzierte Vorrichtung. In Anlehnung an die natürlichen Verhältnisse[2] soll die Apparatur einen turbulenten Gasaustausch des Bodens herbeiführen und die von einer bestimmten Gewichtsmenge Boden innerhalb einer gewissen Zeit produzierte Atmungskohlensäure zur Absorption bringen. Im wesentlichen besteht die Apparatur aus dem *Atmungskölbchen*, das die Bodenprobe enthält, und dem damit verbundenen *Absorptionskölbchen*, in welches eine gewisse Menge Barytlauge von bekanntem Gehalt gebracht wird. Diese beiden Kölbchen sind — wie aus der Abbildung ersichtlich ist — an ein 25 cm hohes und etwa 1 cm weites, mit Quecksilber gefülltes *Manometerrohr M* angeschlossen, auf das durch eine Verbindung bei *a* Druckschwankungen übertragen werden, die ein elektrisch angetriebener und geschlossener Blasebalg erzeugt. Das im Manometer befindliche Quecksilber pulsiert ungefähr 50mal in der Minute mit einer Hubhöhe von etwa 50 mm und erzeugt so ständige Luftdruckschwankungen im Atmungsraum. Dadurch wird das Hohlraumvolumen des Bodens durchlüftet, d. h. die dort produzierte Atmungskohlensäure herausgeschafft und der Absorption durch die Barytlauge zugeführt. Wiewohl durch diese Vorkehrung der Vorgang der natürlichen Bodendurchlüftung qualitativ nachgeahmt wird, muß man sich vergegenwärtigen, daß die in der Natur herrschenden turbulenten Luftdruckschwankungen um ein Vielfaches geringer sind als bei vorliegender Versuchsanordnung, die mit Absicht eine optimale Bodendurchlüftung anstrebt, um die gesamte Atmungskohlensäure zu erfassen.

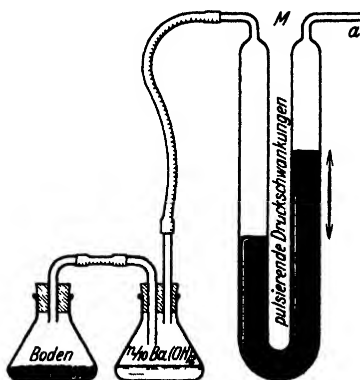


Abb. 1.
Apparat zur Bestimmung der Bodenatmung.

[1] *K. Amberg*, Mitteil. d. Naturf. Ges. Luzern 47, 311, 1917. — [2] Vgl. *W. Schmidt* u. *P. Lehmann*, Sitz.-Ber. d. Akad. d. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. IIa, 138, 823—852, 1929.

Für die nachstehend mitgeteilten Versuche wurden jeweils 10 g lufttrockener Boden verwendet und soviel Wasser zugesetzt, wie 60 % der Wasserkapazität entspricht. Die vorgelegte Barytlauge wurde nach $4^1/_2$tägiger Versuchsdauer titriert. Die Temperatur war während der Versuchsdauer auf 22 bis 25° konstant gehalten. Da von dem skizzierten Atmungsapparat mehrere gleichzeitig an den Blasebalg angeschlossen waren, sind die anschließend mitgeteilten Ergebnisse gleichzeitig unter denselben Durchlüftungsverhaltnissen gewonnen worden.

Tabelle X.

Stationen	Bodenatmung in mg CO_2		
	je g lufttrockenen Boden	je g Trockensubstanz	je ccm Trockensubstanz
Mn	3,64	5,33	12,6
Mn_u	3,86	5,20	11,3
Sr	3,41	8,10	13,8
Sl	2,62	3,44	7,3
Sl_u	3,35	3,70	8,0
Ns	3,31	4,85	9,3
Fd	3,22	4,60	7,7
Gm	3,63	7,23	16,1
Gm_u	3,86	4,70	11,4
Mu	3,60	4,22	7,8
Mu	3,97	4,70	11,4

Unter den in vorstehender Tabelle X enthaltenen Zahlen fallen vor allem die niederen Atmungswerte je g lufttrockenen Boden für *Sl*, Sl_u und *Fd* auf, denen aber keineswegs die niedrigsten Keimzahlen entsprechen; nun zeigen diese Böden eine relativ hohe Sorptionskapazitat, so daß es den Anschein hat, als ob die Atmungskapazität der Mikroben durch deren Adsorption an die kolloiden Bodenteilchen eine Einbuße erleide. Diese Vermutung steht im Einklang mit den Feststellungen von *Dianowa* und *Woroschilowa*[1], sowie *Chudiakow*[2], wonach die Adsorption der Bakterien eine starke Abnahme ihrer chemischen Tätigkeit zur Folge hat.

Die Behauptung *Remys*[3], derzufolge die CO_2-Entwicklung in engster Beziehung zur Schimmelpilzentwicklung steht und sich wie diese mit dem p_H ändert, konnte jedoch nicht bestätigt werden.

[1] *E. W. Dianowa* u. *A. A. Woroschilowa*, J. f. wiss. Landwirtsch. **2**, Nr. 9, 1925. — [2] *N. Chudiakow*, Centralbl. f. Bakt. II, **68**, 345—358, 1926; vgl. auch *A. R. Minenkow*, ebenda II, **78**, 109, 1929. — [3] *Th. Remy*, Deutsch. landw. Presse **53**, 514, 1926.

Zusammenfassung.

1. Es werden sieben kleinklimatische Stationen der biologischen Station *Lunz am See*, betreffend die geologischen und klimatischen Verhältnisse, charakterisiert. Besonders hervorzuheben sind das gleichmäßige ausgeglichene Klima der Stationen *Nos* und *Finstergstaud* einerseits und die bedeutenden Schwankungen der Temperatur und Luftfeuchtigkeit auf den Stationen *Gstettneralm* und *Meisterau* andererseits.

2. Die bodenkundliche Untersuchung der Erdproben dieser kleinklimatischen Stationen ergab vor allem eine Ausnahmestellung für die auf vorwiegend dolomitischem Untergrund sich vorfindenden Stationen *Nos* und *Finstergstaud*. So weisen deren Böden eine für ihre nicht unbedeutende Höhenlage (über 1000 m) relativ hohe Sorptionskapazität und Basenreserve und demnach alkalische Reaktion sowie ein enges Ca/Mg-Verhältnis auf; ferner ist die Pufferung dieser beiden Böden im Vergleich zu den übrigen außerordentlich gut.

3. Der Wasser- und Lufthaushalt der untersuchten Böden ist auf deren Mikrobenbestand ohne erkennbaren Einfluß, was nicht wundernehmen kann, da die meisten Bodenproben infolge des feuchten Klimas des *Lunzer* Gebietes im Zeitpunkte der Probenahme mit Wasser stark übersättigt waren.

4. Ein Zusammenhang zwischen Zahl und Art der Keime und *einem bestimmten* Umweltfaktor, wie Klima oder physikalisch-chemische Bodeneigenschaften, war nicht zu erkennen, was entweder in dem Zusammenwirken *mehrerer* dominierender Faktoren oder in dem überragenden Einfluß der Art der Pflanzendecke auf den Mikrobenbestand seinen Grund haben kann. Der Einfluß der Pflanzendecke könnte auch die Erklärung für die zunächst befremdliche Tatsache liefern, daß selbst in ihren Eigenschaften ziemlich weitgehend übereinstimmende Böden aus klimatisch ähnlichen Lagen in ihrem Mikrobenbestand bedeutende Abweichungen zeigen.

5. Eine Korrelation nach *Jensen* zwischen dem Quotienten aus den Keimzahlen der *Schimmelpilze* und der *Bakterien* + *Actinomyceten* einerseits und dem Wasserstoffexponenten andererseits konnte nicht festgestellt werden, war aber auch kaum zu erwarten.

6. *Aerobe Stickstoffbinder* konnten im Einklang mit *Fehér* auch in saurem Waldboden (bis $p_H = 4{,}7$) nachgewiesen werden, jedoch fehlte diese Organismengruppe trotz günstiger p_H-Werte in den ein enges Ca/Mg-Verhältnis aufweisenden Stationen entweder ganz (*Finstergstaud*), oder sie waren nur spärlich anzutreffen (*Ns*, *Mn$_u$*).

7. *Amylobacter* wurde in Übereinstimmung mit *Amberg* im allgemeinen reichlicher vorgefunden als die aeroben N-Binder.

8. Die Intensität der Kohlensäureatmung wird anscheinend nicht nur durch den Keimgehalt, sondern auch durch die Adsorptionskraft der Böden bestimmt. So zeigten Böden von geringer Sorptionskapazität trotz relativ niedrigen Keimgehalts ziemlich bedeutende Atmungswerte (Gm_u), während diese bei keimreichen, aber stark adsorbierenden Böden wesentlich niedriger lagen (*Sl*, Sl_u, *Fd*).

9. Eine Beziehung der Kohlensäureatmung zur Schimmelpilzentwicklung und zum p_H war nicht zu erkennen[1].

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sei für die gewährte Unterstützung ergebenst gedankt.

[1] Ein wesentlich klarerer Einblick in die Beziehungen zwischen Mikrobenbestand und Umweltfaktoren hätte sich bei Wiederholung der Untersuchungen zu verschiedenen Jahreszeiten gewinnen lassen, doch war dies aus äußeren Gründen nicht durchführbar. Wohl aber sind solche laufende Untersuchungen bei *Schimmelpilzen*, *Hefen* und *Actinomyceten* durchgeführt worden bzw. derzeit noch in Durchführung begriffen, worüber zu einem späteren Zeitpunkte berichtet werden wird.

(Aus dem Institut für experimentelle Zoologie, Stockholm, und aus der Zentralanstalt für Landwirtschaftliches Versuchswesen, Experimentalfältet bei Stockholm.)

Die Mikrofauna des Bodens, ihr Verhältnis zu anderen Mikroorganismen und ihre Rolle bei den mikrobiologischen Vorgängen im Boden[1].

Von

M. Koffman.

Mit 13 Textabbildungen.

(Eingegangen am 31. Januar 1934.)

Einleitung.

Im Jahre 1875 haben *Aubergier* (7) und *Dumas* (90) bei Versuchen, die *Phylloxera* des Weinstocks mit Schwefelkohlenstoff auszurotten, eine so starke Erntevermehrung beobachtet, daß diese nicht durch die Vertilgung des schädlichen Insekts allein erklärt werden konnte, sondern auch auf anderen Faktoren beruhen mußte. Die Erhöhung der Fruchtbarkeit des Bodens nach seiner Behandlung mit verschiedenen antiseptischen Mitteln oder mit Wärme, die sogenannte partielle Sterilisierung, ist seitdem von sehr vielen Forschern bestätigt worden; die Ursachen dieser Bodenverbesserung sind indessen trotz vieler Erklärungsversuche und Theorien noch nicht klargelegt (94, 116 bis 119, 122, 123, 148 bis 158, 194, 195, 245, 301 bis 305, 367).

Von den verschiedenen Theorien hat bislang keine auch nur annähernd so stark die Aufmerksamkeit auf sich gezogen wie die von *Russell* und *Hutchinson* (334, 335) 1909 aufgestellte *Protozoen-Theorie*. Nach dieser verzehren die in großer Menge im Boden vorkommenden Protozoen die für die Pflanzen nützlichen Bakterien, wodurch sie die Fruchtbarkeit des Bodens herabdrücken, auch bei Vorhandensein der für die Pflanzen notwendigen Salze. Die Theorie ist von den meisten englischen Bodenprotozoen-Forschern anerkannt worden und hat auch in anderen Ländern viele Anhänger, aber auch Gegner, besonders unter den amerikanischen Bodenprotozoen-Forschern, gefunden. Einige Forscher stellen sogar darüber hinaus das Vorkommen aktiver Protozoen

[1] Ausgeführt mit Unterstützung der Universität zu Stockholm, der Stiftung „Lars Hiertas Minnesfond", der Verwaltung für „Peter Wahlbergs fond", der Königlichen Landwirtschaftsakademie und „Längmanska Kulturfonden". Die Arbeit erscheint aus technischen Gründen in wesentlich gekürzter Form.

im Boden überhaupt in Abrede. Welches Interesse die Bodenprotozoen in theoretischer und praktischer Hinsicht erregt haben, geht vielleicht am besten aus einem Vergleich zwischen der Anzahl einschlägigen Arbeiten vor und nach der Veröffentlichung der Protozoen-Theorie hervor. Obwohl Protozoen aus dem Boden mehr als 70 Jahre vorher bekannt waren, wurden bis dahin über sie nur einige zehn Arbeiten, hauptsächlich in Deutschland, während der darauffolgenden kurzen Zeit von etwa 20 Jahren dagegen viele hundert Arbeiten in aller Welt veröffentlicht, und es erscheinen immer weitere Arbeiten. Die Ergebnisse sind jedoch oft widersprechend, so daß wir bis jetzt keine Gewißheit haben, welche Formen wirklich Bodenprotozoen sind, wie groß ihre Anzahl ist, und noch weniger, welche Rolle sie bei den mikrobiologischen Vorgängen im Boden spielen.

Geschichtliches.

Mit Rücksicht auf das in dieser Arbeit behandelte Problem dürfte eine kurze historische Übersicht der Arbeiten über die Protozoen und ihre Rolle im Boden am Platze sein.

Schon 1719 wurden interessante Beobachtungen über lebende Protozoen, die aus dem Sand einer Dachrinne erhalten waren, von *Leeuwenhoek* (223) gemacht. 1837 berichtete *Ehrenberg* (98) über mehrere Protozoenarten aus Bodenaufschlämmung. Das Interesse scheint jedoch nicht groß gewesen zu sein, da man während der folgenden Dezennien nur mehr oder weniger zufällige Mitteilungen über Bodenprotozoen antrifft. So hat derselbe Forscher in einigen Arbeiten (96 bis 99) mehrere Protozoenarten, besonders *Thecamoeben*, aus in verschiedenen Weltteilen gesammelten Proben von Acker- und Waldboden, Vulkanasche, Schlamm usw. beschrieben. Von besonderem Interesse ist seine Mitteilung über Protozoen aus gefrorenen, während der zweiten deutschen Nordpolarfahrt gesammelten Bodenproben (101). Unter anderen älteren Protozoenforschern, die Protozoen aus dem Boden beschrieben haben, sind *Dujardin* (89), *Claparède* und *Lachmann* (47), *von Post* (310), *Gagliardi* (128) und *Pleas* (309) zu nennen. *Greeff* (140 bis 144) gehörte zu den Forschern, welche systematisch Protozoen aus Boden zu isolieren und zu bestimmen versuchten. Zu den frühesten Untersuchungen über Bodenprotozoen gehören auch diejenigen *Mereschkowskys* (259) und *Leidys* (224). Von den vom Erstgenannten beschriebenen etwa 150 Protozoenarten aus dem nordlichen Rußland waren viele aus Boden und Sand isoliert. Seit den neunziger Jahren des vorigen Jahrhunderts haben *Celli* und *Fiocca* (38, 39), *Beijerinck* (16), *Frosch* (125) und *Tsujitani* (377) verschiedene Amoeben durch Bodenimpfung auf Gelatine isoliert. Einige Jahre darauf haben *Penard* (289, 290, 294), *Nägler* (275) und *Grosse-Allermann* (160) verschiedene durch Impfung von Boden auf Agar erhaltene Protozoenformen beschrieben. Protozoen aus Moorboden untersuchten mehrere Forscher (9, 10, 100, 166, 167, 193, 274, 288, 291 bis 293, 319, 351, 364).

Schon frühzeitig haben manche Forscher (270, 349) auch versucht, einen Zusammenhang zwischen Mikrofauna und Beschaffenheit des Bodens zu finden. Auch die Bedeutung der Protozoen in physiologischer Hinsicht (25,

299, 320) hat schon einige der älteren Forscher interessiert. Unter den neueren Forschern, nach deren Meinung die Protozoen in großen Mengen im Boden vorkommen und eine wichtige Rolle beim Stoffumsatz spielen, u. a. durch Einwirkung auf Bakterien, Algen und Pilze, sind *Störmer* (368, 369), *Hiltner* (169) und *Wolff* (406, 407) zu erwähnen.

Russell und *Hutchinson* (334, 335), deren Protozoen-Theorie einen Wendepunkt im Studium der Bodenprotozoen bildete, beobachteten bei Behandlung des Bodens mit Wärme oder antiseptischen Mitteln eine Verminderung der Anzahl der Protozoen bis zum völligen Verschwinden und gleichzeitig eine Vermehrung der Bakterien und eine Steigerung der Ammoniakbildung. Sie schlossen daraus, daß die Protozoen ein hemmender Faktor für die Fruchtbarkeit des Bodens seien, weil sie die für die Pflanzen nützlichen Bakterien verzehrten, und meinten, es müsse unter normalen Verhältnissen ein Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Mikroorganismen im Boden bestehen. Die Bakterien könnten sich nicht unbegrenzt entwickeln, sondern würden in ihrer Entwicklung durch die Protozoen gehemmt, die ihrerseits durch Mangel an Bakterien, ihrer Nahrung, zurückgehalten würden. Durch partielle Sterilisierung des Bodens würden die phagocytären Protozoen getötet oder in ihrer Entwicklung gehemmt, die Sporen der Bakterien verblieben dagegen unbeschädigt und entwickelten sich ungehindert, nachdem die Wirkung der antiseptischen Mittel, z. B. nach dem Verdunsten, aufgehört habe. Die Bakterien könnten auf solche Weise das Vielfache der normalen Anzahl erreichen, was zu einer Steigerung der Ammoniakbildung und somit der Fruchtbarkeit führe. Schon bevor die Protozoen-Theorie als solche ausgearbeitet wurde, hat *Russell* (324, 325), teilweise zusammen mit Mitarbeitern (332, 333, 336, 337), versucht, die Ursache der günstigen Einwirkung der partiellen Sterilisierung unter biologischem Gesichtspunkt zu erklären. Auch nach der Veröffentlichung der Protozoen-Theorie haben sich *Russell* (326 bis 330) und *Hutchinson* (182, 183) mit den Gegnern der Theorie auseinandergesetzt und versucht, weitere Beweise für ihre Richtigkeit zu erbringen.

Cutler, der mit seiner Schule gegenwärtig eine führende Stellung innerhalb der Bodenprotozoenforschung einnimmt, hat eine besondere Methodik für das Studium der Bodenmikrofauna und der mit der Protozoen-Theorie zusammenhängenden Probleme ausgearbeitet. Er züchtete z. B. gewöhnliche Bodenbakterien mit und ohne Protozoen und fand (70, 71), daß die Anzahl Bakterien in dem protozoenfreien Medium bedeutend höher war als in dem mit *Amoeben* und *Flagellaten* gemischten Medium. Aus den zusammen mit *Crump* (73) ausgeführten Untersuchungen schließt *Cutler*, daß aktive Protozoen im Boden vorhanden sind, und daß zwischen ihnen und den Bakterien ein umgekehrtes Verhältnis besteht. Eine Bestätigung des Einflusses der Protozoen auf die Bakterientätigkeit finden wir auch in einer späteren Untersuchung derselben Forscher (76), in der die Einwirkung auf die CO_2-Bildung in Sand und Boden verfolgt wurde. Durch Untersuchungen, die zusammen mit *Dixon* (78) ausgeführt wurden, bewies *Cutler*, daß die *Flagellaten* sich sogar bei so niedrigem Wassergehalt, wie 4 bis 6 %, im Boden entwickeln können. Umfangreiche Untersuchungen über die Mikrofauna und Mikroflora des Bodens, die systematisch während eines Jahres von *Cutler*, *Crump* und *Sandon* (77) ausgeführt wurden, zeigten ebenfalls, daß die Anzahl *Amoeben* und Bakterien im Boden sich umgekehrt verhält. Bei umfangreichen Untersuchungen über die Protozoen des Bodens bestimmte *Sandon* (339) die Bodenmikrofauna nicht nur in

vielen Bodenproben aus England, sondern auch in Bodenproben aus verschiedenen Weltteilen. Nach *Crump* (65) kommen gewöhnlich *Flagellaten*, *Amoeben* und *Thecamoeben* in großer Menge im Boden vor, und die Anzahl der *Amoeben* ist der Anzahl der Bakterien umgekehrt proportional. *Thornton* und *Smith* (373) fanden indessen, daß unter den Protozoen die *Flagellaten* als Vertilger der Bakterien die größte Rolle spielen. Nach *Hall* (161, 162) und *Dyer* (91) wird die Fruchtbarkeit des Bodens durch die Wirksamkeit der Protozoen gehemmt. In einer größeren Arbeit von *Jacobs* (186) wird angegeben, daß die Anzahl der *Amoeben* und die der Bakterien in umgekehrtem Verhältnis zueinander standen. Ein Zusammenhang zwischen *Flagellaten* und Bakterien konnte dagegen von dem Forscher nicht festgestellt werden. Nach einer Reihe von Arbeiten *Goodey*s (130 bis 137) dürften indessen weder die *Amoeben* noch die *Flagellaten* auf die mikrobiologischen Vorgänge im Boden einwirken, und nach *Matthews* (254) hängt die Vermehrung der Bakterien nach partieller Sterilisierung nicht so sehr von der Abtötung der Protozoen wie vom Nahrungswert der antiseptischen Mittel ab. *Buddin* (29) fand, daß eine partielle Sterilisierung des Bodens mit genügender Menge antiseptischer Mittel nur die größeren Protozoen und die nitrifizierenden Mikroorganismen tötet. Trocknen des Bodens wirkte ebenso (30) wie partielle Sterilisierung.

Der atmosphärische Stickstoff wird nach *Cutler* und *Bal* (72) beim Vorhandensein der Protozoen besser von *Azotobacter* fixiert als ohne diese. In gleicher Richtung liegen auch *Nasir*s (276) und *Meiklejohn*s (256, 257) Untersuchungen.

Nach *Goodey* (131) sollen die *Ziliaten* im Boden nur in Cystenform vorkommen. Dagegen haben die Untersuchungen von *Martin* (248, 249) und *Martin* und *Lewin* (250, 251) auf Grund eines besonderen Verfahrens eindeutige Beweise für das Vorkommen von aktiven Protozoen in einigen kranken Böden erbracht.

Die Protozoen in dänischen Böden wurden von *Christensen* und *Jensen* (43) und *Molér* (263) untersucht. Nach jenen verminderten die Protozoen die Anzahl der Bakterien, nach *Molér* spielen die Protozoen im Stickstoffhaushalt des Bodens durch Vernichtung von *Azotobacter* eine große Rolle.

Unter den verhältnismäßig wenigen französischen Untersuchern der Bodenmikrofauna und ihrer Rolle konnten *Truffaut* und *Bezssonoff* (376) eine schädliche Einwirkung der Protozoen auf die Bakterienentwicklung nicht beobachten. In einer späteren Arbeit zeigt sich jedoch *Truffaut* (375) ebenso wie *Perey* (295) als Anhänger der Protozoen-Theorie.

Die Untersuchungen von *Holdhaus* (176) über die Bodenmikrofauna in Österreich zeigten, daß die Protozoen ein wesentlicher Faktor für die Bodenfruchtbarkeit sind.

Von den ungarischen Forschern über die Protozoen im Boden konnte *Telegdy-Kovats* (371) feststellen, daß die Stickstoffixierung besser bei Vorhandensein von Protozoen erfolgt. Nach *Fehér* und *Varga* (109, 379), die eine große Anzahl aktiver und encystierter Formen beobachteten, waren jedoch bestimmte Beziehungen zwischen Protozoen und Bakterien nicht zu erkennen.

Von deutschen Forschern schreibt *Francé* (120, 121) den Protozoen eine wichtige Rolle für den Stoffumsatz im Boden zu. *Loew* (229 bis 231) unter-

suchte die Bodenmikrofauna nicht nur an verschiedenen Stellen in Deutschland, sondern auch an außereuropäischen Plätzen wie Japan, Porto Rico usw. *Oehler* (280) isolierte *Amoeben* aus dem Boden. Nach *Löhnis* (233) finden sich Protozoen in durchweichten Böden ebenso wie in normalen Wiesen-, Wald- und Ackerböden. Gemeinsam mit *Löhnis* versuchte *Cunningham* (67) durch Erwärmung des Bodens das Zahlenverhältnis zwischen aktiven und encystierten Protozoen im Boden zu bestimmen, die Ergebnisse waren aber nicht befriedigend. Auch die in einer späteren Arbeit *Cunninghams* (66) versuchte Trennung der aktiven und passiven Formen durch Benutzung von KOH und Giften führte nicht zum Erfolg. *Wolff* (407) konnte 13 *Rhizopoden*-, 19 *Flagellaten*- und 19 *Ziliaten*-Arten aus Boden bestimmen. Eine interessante Arbeit über Bodenprotozoen, besonders *Thecamoeben*, ist kürzlich von *Volz* (380) veröffentlicht worden, wobei 21 *Thecamoeben* beschrieben und ihre verschiedenen Entwicklungsstadien näher untersucht wurden. *Emmerich*, *Leiningen* und *Loew* (102) konnten bestätigen, daß die Protozoen die Bakterienentwicklung hemmen. Nach *Fischer* (114, 115) besteht die Bodenmikrofauna aus Formen, die im übrigen als Luft-, Wasser- und Moosbewohner bekannt sind. Die Protozoen kommen nach seiner Meinung in zu geringer Anzahl vor, als daß sie eine Rolle im Stoffwechsel spielen könnten. *Scheffelt* (344 bis 346) hat in Moor- und Torfböden Süddeutschlands viele *Rhizopoden, Ziliaten* und *Flagellaten*, *Harnisch* (164) in moosbewachsenem Boden 38 *Testaceen*-, 2 *Heliozoen*- und 6 *Ziliaten*-Arten gefunden.

Von italienischen Forschern fanden *Cauda* und *Sangiorgi* (36) in den Reisfeldern von Premont und der Lombardei stets *Amoeben*, aber nicht immer *Ziliaten* und *Flagellaten*. Nach *Coppa* (64) bilden die *Rhizopoden* die Mehrzahl der Bodenprotozoen; von 62 bestimmten Arten waren 35 dem Wasser und dem Boden gemeinsam.

Für die Alpengegend fand *Feuilletau de Bruyn* (111), daß normal auch während der dürren Sommerzeit viele *Ziliaten* und *Flagellaten* und wenige *Amoeben* vorkommen.

Von rumänischen Forschern liegen Untersuchungen von *Chiritescu-Arva* (41) vor, der im Boden mehr als 50 Arten bestimmen konnte.

Unter den zahlreichen russischen Bodenprotozoen-Forschern fand *Wojtkiewicz* (405), daß die Protozoen für die Anzahl der Bakterien im Boden bestimmend seien. *Novikoff* (279) erhielt aus Boden 39 Arten, die sich auf 31 Genera verteilen. Bodenproben, die mehr als zehn Jahre lang trocken aufbewahrt waren, ergaben nach Einführen in steriles Wasser *Ziliaten* und *Flagellaten*. Auch nach *T. M.* und *M. P. Winogradow* (400) kommen die Protozoen in aktivem Zustand im Boden vor und zwar in einer Anzahl, die von Temperatur, Wasserstoffionenkonzentration, Feuchtigkeit und Beschaffenheit des Bodens im allgemeinen abhängig ist. *Dogiel, Rammelmeyer* und *Strelkov* (85) fanden, daß der Boden in der Umgegend von Leningrad zwar Protozoen enthält, aber in so geringer Anzahl, daß sie nicht von Bedeutung sein können. Auch *Sewertzoff* (353, 354) die umfangreiche Untersuchungen über *Amoeben* ausgeführt hat, ist der Meinung, daß die Anzahl aktiver *Amoeben* in normalem Boden zu klein ist, um eine größere Rolle für die Fruchtbarkeit des Bodens zu spielen, und ebenso spricht *Alekseieff* (1, 2) den Protozoen im Boden jede Bedeutung ab. *Yakimoff* und *Zérèn* (422) fanden indessen viele *Rhizopoden, Flagellaten* und *Ziliaten* in der Nähe von Leningrad.

Von *Yakimoff* und *Zérèn* (423) wurden auch Bodenproben aus Turkestan untersucht. Böden, die reich an organischen Stoffen waren, ergaben dabei die größte Anzahl aktiver Protozoen. Auch *Brodsky* (28) hat Mitteilungen über die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Protozoenfauna in Böden Mittelasiens gemacht.

Nach *Lebedjantzevs* (221) Untersuchungen soll das Austrocknen des Bodens ähnliche Veränderungen seiner Fruchtbarkeit verursachen wie die partielle Sterilisierung: Die Anzahl der Mikroorganismen nimmt ab, während die Menge von löslichem Stickstoff, Phosphor und anderen Stoffen steigt. *Troitzky* und *Zérèn* (374), die im Zusammenhang mit den Mikrofaunastudien Vegetationsversuche mit Hafer vorgenommen haben, fanden, daß die auftretenden Arten der Protozoen während des Wachstums der Pflanzen wechselten. Nach *Federowa-Winogradowa* (107, 108) gestaltet sich die Entwicklung von *Azotobacter* und seine Stickstoffixierung beim Vorhandensein von *Amoeben* kräftiger als in Abwesenheit der Protozoen.

Nach *Hutchinson* (179 bis 181), der seine Untersuchungen in Indien ausführte, sind die Lebensprozesse der Protozoen und Bakterien mit der Bildung von CO_2 und anderen Gasen verbunden. *A. Howard* und *G. L. C. Howard* (177) bestätigen die Protozoen-Theorie. Eine sehr große Anzahl Bodenprotozoen hat der indische Forscher *Chaudhuri* (40) beschrieben; er fand sie kleiner als die aquatischen Formen.

In Japan konnte besonders während der letzten Jahre ein lebhaftes Interesse für das Studium der Bodenmikrofauna beobachtet werden. Nach *Shibuya* (356) sind die drei Gruppen der Protisten in japanischen Böden reichlich vertreten. Auch *Hino* (171 bis 174) bestätigt in umfangreichen Untersuchungen das Vorkommen von Protozoen, findet aber ihre Anzahl in normalem Boden allzu klein zur Erreichung einer Verminderung der Bakterienzahl. Die Untersuchungen von *Hirai* und *Hino* (175) zeigen in Übereinstimmung mit denen europäischer Forscher, daß die Stickstoffixierung von *Azotobacter* beim Vorhandensein von Protozoen stimuliert wird.

Bodenprotozoen von Java sind von *C. A. H. v. Wolzogen Kühr jr.* (408) untersucht worden; nach seiner Meinung sind sie als ein biologischer Faktor im Boden zu betrachten.

Eine große Anzahl Untersuchungen über Bodenprotozoen und ihre Rolle in australischen Böden sind von *Greig-Smith* (148 bis 158) veröffentlicht. Ohne das Vorkommen der Protozoen und ihren Einfluß auf den Stoffwechsel im Boden zu verneinen, kommt er auf Grund seiner Versuche zu der Auffassung, daß die günstige Einwirkung einer partiellen Sterilisierung hauptsächlich auf der Zerstörung von Bakterientoxinen und Auflösung von Wachsstoffen, welche die Bodenpartikeln umgeben, beruht. *Jensen* (187) verteidigt im Gegensatz zu *Greig-Smith* die Protozoen-Theorie.

In Ägypten haben *Ross* und *Thomson* (321) feststellen können, daß sowohl *Rhizopoden* als *Flagellaten* und *Ziliaten* vorhanden sind, wobei die *Amoeben* vorherrschen. Eine aktive Mikrofauna in Bodenproben aus Kongo wurde von *Sandon* (339) gefunden. *Fantham*, *Taylor* und *Paterson* (105, 106) haben bei umfangreichen Untersuchungen über die Mikrofauna in südafrikanischen Böden 72 Protozoenarten festgestellt. Nach *Fletcher* (116 bis 119), der sich nicht so sehr für die Protozoen selbst wie für die Ursachen der gesteigerten Fruchtbarkeit im Boden nach Sterilisierung interessiert,

beruht die Verbesserung der Bodenfruchtbarkeit mehr auf der Zerstörung toxischer Stoffe als auf einer Steigerung der Bakterienzahl und der Ammoniakmenge.

Das Vorkommen von Bodenprotozoen in amerikanischen Böden wurde sehr eingehend untersucht. Nach *Koch* (196 bis 198), *Fellers* und *Allison* (110), *Lodge* und *Smith* (228) kommen Protozoen in aktivem Zustand in normalem Boden nicht einmal bei verhältnismäßig hohem Wassergehalt vor. Nach *Bolley* (21 bis 23) sollen parasitische Pilze, nicht Protozoen, für die Fruchtbarkeit des Bodens den hemmenden Faktor bilden. *Kofoid* (206) berichtet jedoch über *Amoeben*, die er in normalem Boden beobachtete. Das Vorkommen von Protozoen in Michigan-Böden ist auch von *Rahn* (316) bestätigt worden. Von Interesse sind Untersuchungen von *Sandon* (340) und *Lochead* (226, 227) über die Bodenmikrofauna Amerikas, wo sie aktive Protozoen sowohl während des Sommers als auch im Winter fanden. *Allison* (4), *Sherman* (357, 358), *Hills* (168) sowie *Kopeloff*, *Lint* und *Coleman* (208, 213) leugnen nicht das Vorkommen von Protozoen im Boden, wohl aber ihre Bedeutung für die Bakterienentwicklung und die Bodenfruchtbarkeit.

Die partielle Sterilisierung rottet nach *Gainey* (127) und *Fred* (124) die Protozoen, die in aktivem Zustande im Boden vorkommen, keineswegs aus. Nach *Fred* (123) dürfte die Bedeutung der Mikrofauna, die ihr nach der Protozoen-Theorie zugeschrieben wird, nicht zutreffen. Auch *Moore* (266) findet die Protozoen-Theorie unhaltbar. Er konnte beobachten, daß *Rhizopoden*, *Flagellaten* und *Ziliaten* nach partieller Sterilisation nicht in ihrer Entwicklung gehemmt wurden. Ähnliches fanden u. a. *Stone* (367) sowie *Seaver* und *Clark* (352), die Untersuchungen mit partiell sterilisierten Böden ausführten. Nach *Skinner* (360), der die Protozoen-Theorie in gewisser Hinsicht bestätigt, sollen die Pilze übrigens keine geringere Rolle als die Protozoen spielen.

Die umfangreichsten Studien über Bodenprotozoen und ihre Rolle im Boden sind von *Waksman* (381, 383) ausgeführt worden. Er fand, daß aktive Protozoen im Boden vorkommen, und daß die *Flagellaten* die größte Anzahl derselben bilden. Die Bodenprotozoen konnten die Bakterienanzahl dezimieren, wirkten aber nicht nennenswert auf die Ammonifikation ein. Zusammen mit *Starkey* (392, 393) fand er, daß die Aktivität der Protozoen viel früher eintritt als die auffallende Abnahme der Bakterienzahl.

In Südamerika sind die Bodenprotozoen und ihre Rolle für den Stoffwechsel im Boden von *Piettre* und *de Souza* (307) untersucht worden, die fanden, daß Sterilität von Böden, in welchen hinreichend organische Substanzen und mineralische Salze vorhanden waren, weder den Protozoen noch den Bakterien zugeschrieben werden konnte, sondern auf toxischen Produkten beruhen mußte, die von zu weit getriebenem einseitigen Anbau von Pflanzen einer und derselben Art herrühren.

Die Bodenprotisten der Hawaii-Inseln wurde z. B. von *Peck* (287), die der Azoren von *Sandon* (338), die der Elephant-, Gough-, St. Helena- und Tristan da Cunha-Inseln von *Sandon* und *Cutler* (341), die von Spitzbergen und Grönland von *Sandon* (339) untersucht, wobei mehrere aktive Formen beobachtet wurden.

Wie aus den hier angeführten Arbeiten ersichtlich, ist es keineswegs geklärt, welche Protozoenformen eigentliche Bodenbewohner sind, wie groß ihre Anzahl ist, und welche Rolle sie für den Stoffumsatz im Boden

spielen. Es ist daher auch völlig dunkel, in welchem Ausmaße die Protozoen-Theorie mit den wirklichen Verhältnissen übereinstimmt. Wenn wir von den widersprechenden Angaben über das Vorkommen der Protozoen im aktiven Zustand im Boden absehen und in Übereinstimmung mit den meisten Forschern das Vorhandensein von Protozoen im Boden annehmen, so ist es nunmehr notwendig klarzulegen, ob sie hemmend, stimulierend oder bedeutungslos für die Bakterienentwicklung sind.

Es galt daher durch entsprechende Untersuchungen zu versuchen, eine Lösung dieser Probleme zu finden.

Arbeitsplan.

Die Bodenprotozoen-Forscher glaubten, daß die indirekten Methoden genügten, ein Bild der wirklichen Mikrofauna des Bodens und ihrer Rolle bei den mikrobiologischen Vorgängen abzugeben. Obwohl die Bodenmikroorganismen freilich nicht in den Bodenpartikeln selbst sondern in der sie umgebenden „kolloidalen Bodenlösung“ leben müssen, dürfte doch ein großer Unterschied zwischen einer solchen „Bodenlösung“ und einem künstlichen Substrat, wie Infuse, Erdextrakt usw. sein. Man findet schon große Abweichungen, wenn man die Mikropopulation im Boden in der Natur und in Proben desselben Bodens vergleicht, die in Büchsen im Laboratorium, selbst bei ähnlichem Wassergehalt usw., aufbewahrt werden (200). Der Unterschied muß daher noch größer sein, wenn man vom Boden stark abweichende Substrate benutzt.

Auch über die mikrobiologischen Vorgänge im Boden dürfen unterschiedliche Ergebnisse bei Verwendung direkter und indirekter Methoden vorliegen (56, 113, 195, 365, 399), obwohl einige Forscher (232, 234, 235, 387) finden, daß man das künstliche Kulturmedium durch geeignete Änderung der Konzentration oder Reaktion usw. den Verhältnissen im Boden nahe bringen könnte.

Es wurde folgendes Verfahren zur Lösung des gedachten Problems für besonders geeignet gehalten: Bodenproben — nicht Agar oder andere künstliche Substrate — von verschiedenen physiologischen Bedingungen, in Hinsicht auf Stickstoffmenge, Kohlenhydratgehalt, Wasserstoffionenkonzentration usw., sollten durch geeignete Behandlung der Bodenproben mit Wärme, antiseptischen Mitteln oder Salzen hergestellt werden. In der einen Hälfte jeder Serie sollte die Mikrofauna durch Zusatz einer gewissen Anzahl geeigneter Protozoen geändert, und in allen sollten während längerer Zeit periodisch die Veränderungen im Stoffumsatz und im Kleinleben verfolgt werden. Vom Stoffumsatz waren die für die Fruchtbarkeit des Bodens wichtigsten

Vorgänge, Ammonifikation und Nitrifikation, zu untersuchen[1]. Temperatur, Feuchtigkeit, Belichtung usw. wurden während der Dauer der Versuche für alle Bodenproben konstant gehalten.

Methodik.

Der zur Untersuchung entnommene Boden wurde erst so weit getrocknet, daß er durch ein 2 bis 3 mm Sieb gesiebt werden konnte. Nach guter Mischung wurden Wasser oder Salze usw. zugesetzt und je 200 g auf Glasbüchsen von 200 ccm Inhalt verteilt. Die Büchsen wurden später mit einem durchbohrten Korkpfropfen verschlossen, durch dessen Loch ein Glasrohr mit Baumwolle gesteckt war. Außerdem wurde der Kork vor Versuchsbeginn paraffiniert, wodurch das Verdunsten des Wassers auf ein Minimum gebracht und gleichzeitig Infektion von außen verhütet wurde, während die Atmung des Bodens unbehindert vor sich gehen konnte. Die Proben wurden während der Versuchszeit bei etwa 20° C gehalten.

Sterilisierung mittels antiseptischer Mittel. 1. Behandlung mit 3% Toluol. Die Bodenproben wurden unter Umrühren mit einer entsprechenden Menge Toluol in 400-ccm-Bechern versetzt, die dann mit einem Uhrglas bedeckt wurden. Nach 24 Stunden wurden die Proben in dünner Schicht auf einer flachen Schale ausgebreitet und stehengelassen, bis der Toluolgeruch verschwunden war, was etwa 48 Stunden in Anspruch nahm. Die für den optimalen Wassergehalt erforderliche Wassermenge wurde danach zugesetzt.

2. Toluolsättigung des Bodens. Erst wurde die Toluolmenge bestimmt, die erforderlich war, die Bodenprobe vollständig zu durchdringen. Die weitere Behandlung wurde wie bei 3% Toluol vorgenommen.

Sterilisierung mittels Wärme. 1. Wärmebehandlung bei 75° C. Die Büchsen mit den Bodenproben kamen in ein Wasserbad, dessen Temperatur allmählich erhöht wurde, bis die Temperatur der Bodenproben 75° C betrug. Eine 3 Stunden dauernde Erhitzung wurde als genügend angesehen.

2. Wärmebehandlung bei 120° C. Um die Totalsterilisierung der Bodenproben zu bewirken, wurden die Büchsen mit Wattepfropfen verschlossen und im Autoklaven 3 Stunden bei 1 Atmosphäre Überdruck, d. h. bei 120° C gehalten[2]. Bevor die Bodenproben zur Verwahrung eingestellt wurden, wurden die Büchsen unter sterilen Bedingungen mit sterilisierten Gummipfropfen verschlossen.

Änderung der Wasserstoffionenkonzentration. Sie wurde bewirkt durch Zusatz von Schwefelsäure bzw. Natriumhydrat.

Änderung des Stickstoffgehalts. Der Stickstoffgehalt wurde durch Zusatz von Ammoniumsulfat erhöht.

---

[1] Auch die Celluloseveränderungen wurden gelegentlich bestimmt, aber sie waren sehr unbedeutend. Die Bestimmung der Veränderungen in CO_2-, wie auch in Phosphat-, Kalium-, Kohlenstoff-, Eisenmenge usw., so erwünscht sie auch wäre, mußte wegen des Umfangs der Arbeit aufgegeben werden. — [2] Wie weiter unten (S. 266) angegeben werden wird, erwies es sich notwendig, um Sterilität zu bewirken, die Autoklavierungszeit zu verlängern und das Verfahren im übrigen etwas zu verändern.

Herstellung von Heuinfus. 10 g Heu wurden 2 bis 3 Minuten in 1 Liter Leitungswasser gekocht. Das Infus wurde filtriert und die während der Herstellung verlorene Wassermenge ersetzt. Bei Bedarf wurde das Infus sterilisiert.

Herstellung von Impfmaterial. 10 g Boden wurden in *Erlenmeyer*-Kolben, die 100 ccm keimfreies Heuinfus enthielten, eingeführt. Nach Verschluß der Kolben mit Watte entwickelte sich nach einigen Tagen in dem Infus eine reiche Mikrofauna und Mikroflora; außerdem bildeten sich viele Cysten.

Wassergehalts- und Trockensubstanzbestimmung. Die abgewogenen Bodenproben wurden im Trockenschrank mindestens 7 Stunden bei 105 bis 110° C gehalten. Nach Abkühlen im Exsikkator wurde der Wasserverlust festgestellt und in Prozent berechnet.

p_H-Bestimmung. Sie wurde elektrometrisch nach der Chinhydronmethode ausgeführt (19, 20, 93).

Ammoniakbestimmung. Sie wurde nach einer von *Bengtsson* (18) ausgearbeiteten Methode ausgeführt.

Salpeterstickstoffbestimmung. Sie wurde nach der Phenol-Disulfonsäure-Methode ausgeführt (11).

Bestimmung des Gesamtstickstoffs. Sie wurde nach *Kjeldahl* vorgenommen.

Untersuchung des Bodenkleinlebens. Für nähere Beschreibung wird auf die Literatur (201 bis 204) verwiesen. Hier werden nur einige Einzelheiten angegeben.

Untersuchung lebender Mikroorganismen. Ein Deckglas wird am Objektträger mit Paraffin oder Wachsmischung nahe den Ecken befestigt, so daß ein gleichmäßiger Abstand zwischen den beiden Gläsern entsteht. Wenn die Bodenaufschlämmung aus einer Kapillarpipette am Rande des Deckglases zugesetzt wird, wird sie in sehr gleichmäßiger Schicht unter dem Deckglas verteilt. Ein derartiges Präparat kann unmittelbar unter dem Mikroskop untersucht werden.

Untersuchung fixierter Mikroorganismen. Um die Entwicklung von Cysten oder die Bewegung und Entwicklung der Mikroorganismen zu verhindern, kann man die Aufschlämmung fixieren. Von einer verhältnismäßig konzentrierten Bodenaufschlämmung, z. B. 5 bis 10 g Boden je 50 ccm Wasser, wird eine gewisse Menge, z. B. 10 ccm, in Fixierungsflüssigkeit, z. B. Pikrin-Essigsäure, eingeführt. Die fixierte Aufschlämmung wird, wie oben gezeigt, unter das Deckglas gebracht.

Herstellung gefärbter Dauerpräparate. Bakterien oder die kleinsten Protozoen können indessen nicht in gewöhnlicher oder fixierter, sondern erst in gefärbter Bodenaufschlämmung unterschieden werden. Mit Vorteil wurde ein Filtrationsapparat, z. B. von *Thiessen*, mit Cellafilter verwendet. Von etwa 5 ccm fixierter Aufschlämmung wird mit Hilfe einer Saugpumpe die Fixierungsflüssigkeit entfernt und die Aufschlämmung ausgewaschen. Die Färbung wird mit 1 %igem Cyanosin „spritlöslich" in 50 %igem Alkohol, die Differenzierung mit destilliertem Wasser ausgeführt, darauf das Einschlußmittel (zwei Teile von 60 gewichts-%iger Lävulose, ein Teil 50 %iger säurefreier Gummi arabicum-Lösung) allmählich zugesetzt. 0,2 bis 0,3 ccm dieser Aufschlämmung wird dann mit Kapillarpipette unter das Deckglas gebracht.

Bestimmung der Anzahl der Mikroorganismen. Um möglichst vergleichbare Werte zu erhalten, wurde die Anzahl Organismen nicht je 1 ccm oder 1 g feuchten Bodens, sondern je 1 g Trockensubstanz berechnet.

Nach einiger Übung kann man sich zur Entdeckung von Protozoen, Algen und ähnlichen größeren Mikroorganismen des Objektivs 4 bedienen, obwohl für die Identifizierung dieser Mikroorganismen oft das Objektiv 7 oder sogar $^1/_{12}$ Öl-Immersion erforderlich sind. Um Bakterien und ähnliche Organismen zu entdecken, muß die Öl-Immersion verwendet werden. Zur Bestimmung der verhältnismäßig geringen Protozoenzahl ist eine Untersuchung, auch bei schwächerer Vergrößerung, von etwa 50 Gesichtsfeldern nötig; zur Bestimmung der erheblich größeren Menge an Bakterien usw. ist schon eine Untersuchung von 40 Gesichtsfeldern ausreichend.

Der mittlere Fehler des Mittelwertes bei der quantitativen Bestimmung der Mikroorganismen wurde nach der bekannten Formel

$$\Sigma \quad \pm \sqrt{\frac{S}{n\,(n-1)}}$$

berechnet, wobei S die Summe der Fehlerquadrate und n die Anzahl der Parallelbestimmungen bezeichnet.

Versuche mit Lehmboden.

Zunächst wurden orientierende Versuche an 12 Serien von Bodenproben unter verschiedenen physiologischen Bedingungen ausgeführt. Jede Serie enthielt 12 Bodenproben zu 200 g. Als Ausgangsboden wurde für diese Versuche ein vom Experimentalfältet bei Stockholm stammender Lehmboden gewählt, der im folgenden „Lehmboden" genannt wird.

Zu jeder Bodenprobe der ersten Serie wurde so viel reines Wasser zugesetzt, daß der für diese Bodenart optimale Wassergehalt von etwa 18% erreicht wurde. Diese Kontrollserie enthielt also Boden, dessen physiologische Beschaffenheit den Verhältnissen im normalen natürlichen Boden sehr nahe kam.

Die Bodenproben der zweiten Serie wurden mit 3% Toluol, d. h. jede mit 6 ccm Toluol behandelt. — Die dritte Serie wurde bei Toluolsättigung behandelt; jede Bodenprobe benötigte etwa 25% Toluol. Der Wasserverlust in den Bodenproben war sehr verschieden, was beweist, daß die Toluolbehandlung unregelmäßig auf die Wasserverdunstung einwirkte. — Die Bodenproben der vierten Serie wurden einer partiellen Sterilisierung bei 75° C unterzogen. — Die Bodenproben der fünften Serie wurden bei 120° C während 3 Stunden im Autoklav erhitzt.

Eine Änderung der Wasserstoffionenkonzentration wurde in den Serien 6, 7 und 8 in der Weise vorgenommen, daß anstatt des p_H-Wertes der Kontrollserie 7,7 (Serie 1) durch Zusatz von Schwefelsäure ein p_H-Wert von bzw. 5,0, 6,0 und 7,0 erhalten wurde.

In den Bodenproben der Serie 9 wurde der Stickstoffgehalt um 30 mg Ammoniakstickstoff je 1 kg Boden über den N-Gehalt des Kontrollbodens erhöht. Schließlich wurden in den Serien 10, 11 und 12 gleichzeitig sowohl Stickstoffgehalt als p_H geändert. Der Stickstoffgehalt wurde auch hier um 30 mg je 1 kg erhöht, der p_H-Wert auf jeweils 5,0, 6,0 und 7,0 gebracht.

Die Mikrofauna und Mikroflora bei der Hälfte der Bodenproben jeder Serie wurde geändert durch Zusatz von Bodenaufschlämmung, die Mikroorganismen enthielt. Das Impfmaterial entsprach den ver-

schiedenen Serien, da es durch Einführung von Bodenproben der entsprechenden Serien in steriles Heuinfus bereitet wurde. Die Artenzusammensetzung gestaltete sich in den verschiedenen Aufschlämmungen verschieden, ebenso schwankte die Anzahl der aktiven Protozoen und der Cysten sehr stark. Der Unterschied dürfte dadurch verursacht sein, daß der zur Impfung verwendete Boden durch seine Pufferwirkung, durch seinen Gehalt an Nährsalzen usw. in den entsprechenden Bodenaufschlämmungen bestimmte physiologische Bedingungen hervorrief, die für die Entwicklung der Protozoen in Aufschlämmungen ausschlaggebend sind (200). So haben sich z. B. im Impfmaterial der 1. Serie während der ersten Tage überwiegend *Colpoda* und kleine *Flagellaten* entwickelt, während die 2. Serie eine Menge *Oxytricha* ergab. Serie 3 dagegen gab keine größeren *Ziliaten*, aber eine Menge kleiner *Flagellaten*. Das Impfmaterial der 4. Serie zeigte nur eine geringe Anzahl kleiner *Flagellaten*. In dem Impfmaterial der 5. Serie, deren Boden auf 120° C erhitzt war, konnten keine Mikroorganismen beobachtet werden. Das Impfmaterial von dem Boden der 6. und 10. Serie mit p_H 5 zeigte außer kleinen *Flagellaten* und *Amoeben Colpoda, Colpidium* und *Chilodon*. Die 7. und 8. Serie zogen die Aufmerksamkeit auf sich durch die Entwicklung von *Oxytricha*, während sich in dem Impfmaterial von der 9. Serie viel *Vorticella* und *Chilodon* und einige *Amoeben* entwickelten. Serie 9 gab gleichzeitig mit *Flagellaten* eine reichliche Entwicklung von *Oxytricha, Colpoda* und *Colpidium*, während in dem Impfmaterial der 12. Serie keine größere *Ziliaten* vorhanden waren. Das Impfmaterial von allen Serien wurde eine Zeitlang stehen gelassen, damit auch eine größere oder kleinere Anzahl Cysten sich entwickeln konnten, da es ja denkbar war, daß aktive Formen bei direktem Einführen in die Bodenproben beschädigt wurden.

Von solchem Impfmaterial wurden, nach gutem Umschütteln, 2 ccm, d. h. 1 % Aufschlämmung, einer entsprechenden Bodenprobe zugesetzt[1]. Die Impfung der verschiedenen Serien der Lehmbodenversuche wurde etwa 2 Wochen nach der Anordnung dieser Serien vorgenommen. Die Veränderungen des Wasser-, des Ammoniak- und des Nitratstickstoffgehalts und der Wasserstoffionenkonzentration wurden periodisch, etwa jeden Monat, in den ungeimpften und geimpften Teilen jeder Serie bestimmt.

Die Ammoniakbildung und Nitrifikation in den verschiedenen Serien, die im Gegensatz zu den übrigen physiologischen Bedingungen große Schwankungen aufwiesen, werden hier einzeln für sich behandelt.

[1] Mit Ausnahme der totalsterilisierten Serie (5), der das gleiche Impfmaterial wie der 1. Serie zugesetzt wurde. Die Menge totalen Stickstoffs, die mit der Aufschlämmung jeder Bodenprobe zugegeben wurde, betrug etwa 0,5 mg.

A. *Die Ammonifikations- und Nitrifikationsprozesse im Kontrollboden (Serie 1).*

Die 1. Serie, die Kontrollserie, zeigt, wie aus dem Diagramm[1] hervorgeht (Abb. 1), keinen Ammoniakstickstoff in den Bodenproben, dagegen steigt die Menge des Salpeterstickstoffs während der Versuchszeit. Da der im Boden befindliche Stickstoff, der in Form hochkomplexer Eiweißverbindungen aufgespeichert sein dürfte, durch die Tätigkeit der Bodenmikroorganismen langsam abgebaut wird, wobei sich Aminosäuren, Säureamiden und Ammoniak bilden, so weist die Abwesenheit des Ammoniaks in dieser Serie darauf hin, daß der im Lehmboden gebildete Ammoniakstickstoff sich unter normalen Verhältnissen in Salpeter und Eiweiß umwandeln dürfte. Nach der Nitratmenge in den ungeimpften und geimpften Serien zu urteilen, scheinen die zugeführten Protozoen eine Hemmung des Nitrifikationsvorganges zu verursachen, die besonders deutlich während des dritten Monats in Erscheinung tritt.

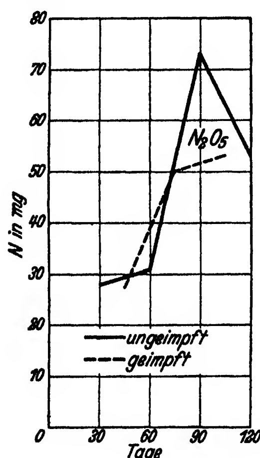


Abb. 1.
Stickstoffumsatz im unbehandelten Boden.

B. *Der Einfluß der flüchtigen antiseptischen Mittel auf die Ammonifikation und die Nitrifikation (Serie 2 und 3).*

Bei den toluolbehandelten Bodenproben (Abb. 2 und 3) finden wir große Abweichungen im Vergleich zum Kontrollboden. Ammoniakstickstoff, der in dem unbehandelten Boden (Serie 1) fehlte, kommt hier vor. Hierbei zeigt die 3. Serie, die mit 25% Toluol behandelt wurde, eine größere Stickstoffmenge als die 2. Serie, die mit 3% Toluol behandelt wurde. In dem geimpften Teil ist der Ammoniakstickstoffgehalt in beiden Serien zu Beginn des Versuchs geringer, was in Übereinstimmung mit der Protozoen-Theorie steht. Nach 3 Monaten findet jedoch eine Umkehrung statt, und die geimpften Proben beginnen jetzt eine höhere Ammoniakstickstoffmenge zu zeigen, was unter dem Gesichtspunkt der Protozoen-Theorie schwer erklärlich ist. Auch der Nitrifikationsprozeß in den Bodenproben wird durch die Toluolbehandlung beeinflußt. Der Verlauf des Vorganges läßt indessen keine sicheren Schlüsse auf die Rolle der zugesetzten Protozoen zu. Von Interesse ist, daß der geimpfte Teil der mit 3% Toluol behandelten Bodenproben eine

[1] Der Raumersparnis wegen sind die Tabellen ausgelassen worden. Die Kurven der wiedergegebenen Diagramme geben den Mittelwert zweier Parallelversuche an.

größere Nitratstickstoffmenge als der ungeimpfte Teil aufweist. Das Verhältnis ist hier also umgekehrt wie bei den unbehandelten Bodenproben der 1. Serie.

Die Toluolbehandlung dürfte einen durchgreifenden Einfluß auf die physiologischen Bedingungen des Bodens ausüben. Dies wird u. a.

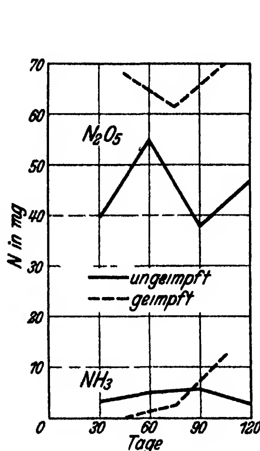


Abb. 2.
Stickstoffumsatz im mit 3 % Toluol behandelten Boden.

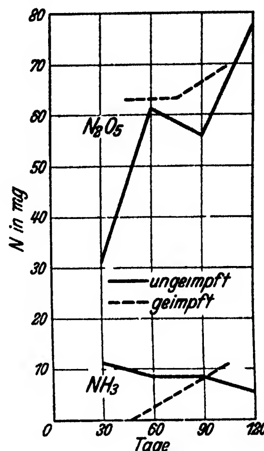


Abb. 3.
Stickstoffumsatz im mit 25 % Toluol behandelten Boden.

auch dadurch bestätigt, daß die Aufschlämmung der toluolbehandelten Bodenproben viel langsamer das Filter passierte, und daß das Filtrat eine gelbe Farbe zeigte.

C. Der Einfluß der Wärmebehandlung auf Ammonifikation und Nitrifikation im Boden (Serie 4 und 5).

Viel stärker als die Toluolbehandlung wirkte die Erhitzung auf den Boden ein. Eine Erwärmung auf 75° C hat die Bildung einer bedeutenden Ammoniakstickstoffmenge zur Folge gehabt. Der Verlauf der Ammonifikation in dieser Serie ist auffallend infolge der hohen Stickstoffmenge, die z. B. 90 mg Ammoniakstickstoff je 1 kg Boden[1] am Anfang des Versuchs in dem ungeimpften Teil beträgt. Diese Ammoniakmenge sinkt jedoch schnell und ist 3 Monate nach Versuchsbeginn auf 50 mg gesunken, wonach sie dann wieder zu steigen beginnt. In dem geimpften Teil ist die Ammoniakstickstoffmenge bei der ersten Analyse bedeutend niedriger als in dem ungeimpften Teil,

[1] Hier, wie an folgenden Stellen, ist mit „Boden" feuchter Boden gemeint.

und die Ammonifikation verläuft regelmäßiger, indem sie während der Versuchszeit langsam steigt. Die durch Zusatz von Protozoen hervorgerufene Hemmung der Ammonifikation, die am Anfang des Versuchs sichtbar ist, verschwindet nach etwa 2 Monaten.

Die Nitrifikation steht in gewisser Gegensätzlichkeit zur Ammonifikation, indem ein Fallen jener einem Steigen dieser entspricht und vice versa.

In den auf 120° C erhitzten Bodenproben ist die Ammoniakmenge gleichfalls bedeutend (Abb. 5). Durch Zusatz von Protozoen ist hier

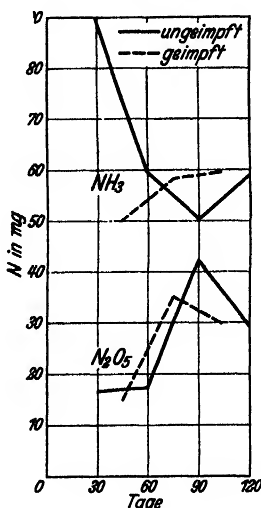


Abb. 4.
Stickstoffumsatz im bei 75° C behandelten Boden.

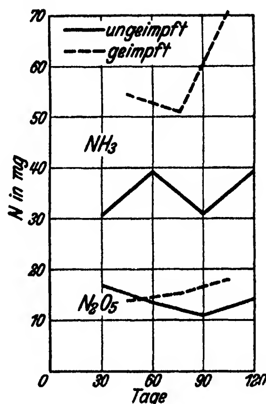


Abb. 5.
Stickstoffumsatz im bei 120° C behandelten Boden.

die Ammonifikation stark gesteigert; die Ammoniakmenge in dem geimpften Teil liegt mit 20 bis 30 mg Stickstoff je 1 kg Boden höher als in dem ungeimpften Teil. Auf Grund der Behandlung sollte man erwarten können, daß der ungeimpfte Teil in der 5. Serie keine lebenden Organismen, der geimpfte dagegen die zugesetzten Protozoen und andere Mikroorganismen enthält. Eine Vermehrung der Ammoniakmenge in diesem widerspricht der Protozoen-Theorie. Eine Erklärung war auf Grund der Ergebnisse dieser Serie nicht leicht zu geben. Es könnten die Protozoen die Wirksamkeit der ammoniakbildenden Mikroorganismen stimulieren, aber es könnte auch der Boden als Substrat für die Entwicklung der zugesetzten Protozoen weniger geeignet gewesen sein als für ammoniakbildende Bakterien usw.

Die Salpetermenge ist im Vergleich zu anderen Serien sehr klein. Sie ist etwas größer in dem geimpften Teil, obwohl die Kurven sich

im Anfang des Versuchs kreuzen. Diese Serie sollte total sterilisiert sein, aber da sowohl Ammonifikation als auch Nitrifikation in den ungeimpften Bodenproben der Serie beobachtet wurden, ist die Sterilität der Serie zweifelhaft.

Der Auszug der wärmebehandelten Bodenproben war noch stärker gelbgefärbt als der der toluolbehandelten.

D. Die Einwirkung der Wasserstoffionenkonzentration auf die Ammonifikation und Nitrifikation im Boden (Serie 6, 7 und 8).

Vergleichen wir die Serien 6, 7 und 8 mit der Kontrollserie, so sehen wir, daß eine Senkung des p_H durch Zugabe von Schwefelsäure von 7,75 auf bzw. 5,0, 6,0 oder 7,0 die Ammonifikation beeinflußt (Abb. 6, 7 und 8). Der Verlauf der Ammonifikationsvorgänge gestattet keinen eindeutigen Schluß auf den Einfluß der Protozoen.

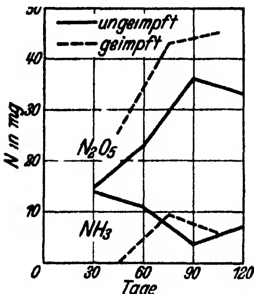


Abb. 6
Stickstoffumsatz im auf p_H 5 angesäuerten Boden

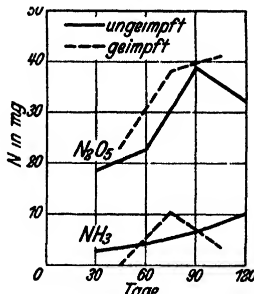


Abb 7
Stickstoffumsatz im auf p_H 6 angesäuerten Boden

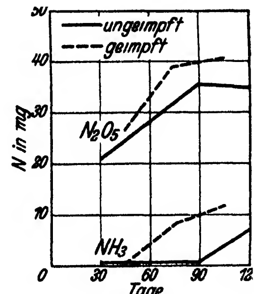


Abb. 8.
Stickstoffumsatz im auf p_H 7 angesäuerten Boden.

Die Nitrifikation verlauft mehr oder weniger normal, d. h. steigt regelmaßig, obwohl die Mengen des Nitratstickstoffs kleiner als in der Kontrollserie sind. Die geimpften Teile der verschiedenen Serien zeigen einen höheren Nitratgehalt als die ungeimpften. Die zugesetzten Protozoen haben den Umsatz des Nitratstickstoffs im Boden im Gegensatz zu dem, was man nach der Protozoen-Theorie erwarten sollte, nicht gehemmt, sondern eher gefördert.

E. Die Einwirkung von Ammoniumsalzen auf die Ammonifikations- und Nitrifikationsvorgänge (Serie 9, 10, 11 und 12).

Der Vergleich der Kontrollserie (Serie 1) mit der 9. Serie, deren Bodenproben 30 mg Stickstoff je 1 kg erhalten haben, zeigt ein Verschwinden des Ammoniakstickstoffs und eine entsprechende Vermehrung des Nitratstickstoffs (Abb. 9). Der Ammoniakstickstoff ist also durch die Wirksamkeit der nitrifizierenden Bakterien binnen

kurzer Zeit zu Nitratstickstoff oxydiert worden. Von den zugesetzten 30 mg kann nur eine unbedeutende Menge Ammoniakstickstoff während der Versuchszeit beobachtet werden. Die Nitrifikationskurven haben in den Serien 1 und 9 sehr gleichartigen Verlauf in den ungeimpften wie auch in den geimpften Teilen. Die geimpften Bodenproben zeigen eine geringere Ammoniak- und Nitratstickstoffmenge; wir können also auch in diesem Falle einen hemmenden Einfluß der Protozoen auf Ammonifikanten und Nitrifikanten beobachten.

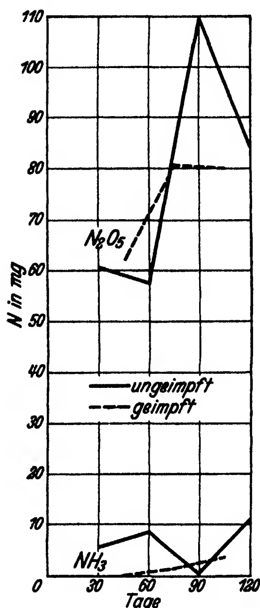


Abb. 9. Stickstoffumsatz im Boden, dem 30 mg N je 1 kg zugesetzt wurde.

Eine Umwandlung von Ammoniakstickstoff in Nitratstickstoff hat auch in der 10. Serie stattgefunden, wo Ammoniakstickstoff zugegeben und das p_H auf 5 geändert wurde; die Nitrifikation hatte hier jedoch nicht denselben Umfang wie in der 9. Serie, und es bleibt eine viel größere Menge des zugesetzten Ammoniakstickstoffs übrig. Offenbar wird bei dem niedrigen p_H-Wert die Nitrifikation gehemmt. Diese Hemmung tritt besonders hervor, wenn man diese Serie mit der entsprechenden 6. Serie vergleicht, die, bei gleichem p_H-Wert 5, keinen Ammoniakstickstoff erhalten hat. Eine geringere Ammoniakmenge in dem geimpften Teil dieser Serie scheint für die Protozoen-Theorie zu sprechen. Es ist aber eigentümlich, daß dies gerade bei solchen Bodenproben der Fall ist, die den niedrigen p_H-Wert 5 haben, wo also Bedingungen herrschen, die für die Protozoenentwicklung, wenigstens in flüssigen Substraten, ungünstig sind.

Die Salpetermenge ist in dem geimpften Teil höher als in dem ungeimpften, die Tätigkeit der Protozoen müßte also für die Nitrifikation förderlich sein, was im Widerspruch zur Protozoen-Theorie steht.

Die Serien 11 und 12, die gut miteinander übereinstimmen, zeigen eine bedeutend kleinere Menge von Ammoniakstickstoff und eine etwas größere Menge Nitratstickstoff als die sauere 10. Serie (siehe Abb. 11 und 12). Sie bestätigen die oben gemachte Erfahrung, daß eine Herabsetzung des p_H-Wertes durch Schwefelsäure die Nitrifikation des Ammoniakstickstoffs hemmt. Die Hemmung ist stärker, wenn man den p_H-Wert von 6 auf 5 statt von 7 auf 6 herabsetzt, die Nitrifikation wird also um so stärker gehemmt, je tiefer unter den Neutralpunkt das p_H geändert wird. Es wäre indessen auch denkbar, daß die Verschlechterung der Nitratbildung auf eine besondere Ursache, z. B. auf

eine Gift-Wirkung der zugesetzten Schwefelsäure zurückzuführen wäre. Dies konnte jedoch mangels einer direkten Untersuchungsmethodik nicht näher untersucht werden.

Überblicken wir den Stoffumsatz in den verschiedenen Serien, so finden wir, daß die Ammonifikation und Nitrifikation in guter Übereinstimmung miteinander stehen, und daß die Behandlung des Lehm-

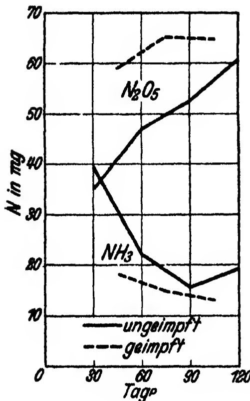


Abb. 10. Stickstoffumsatz im auf p_H 5 angesäuerten Boden, dem 30 mg N je 1 kg zugesetzt wurde.

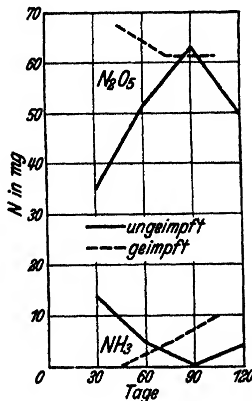


Abb. 11. Stickstoffumsatz im auf p_H 6 angesäuerten Boden, dem 30 mg N je 1 kg zugesetzt wurde

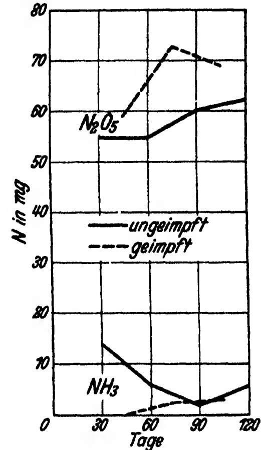


Abb. 12. Stickstoffumsatz im auf p_H 7 angesäuerten Boden, dem 30 mg N je 1 kg zugesetzt wurde.

bodens an und für sich einen viel stärkeren Einfluß auf den Stoffumsatz im Boden ausübte als die zugesetzten Protozoen. Was diese anbelangt, so bestätigten die Versuche die hemmende Einwirkung derselben auf den Stoffumsatz im Boden nicht. Freilich konnte das Schicksal der in den Boden eingeführten Protozoen nicht verfolgt werden; aber die oft gemachte Beobachtung, daß der Zusatz von Protozoen günstig statt hemmend wirkte, deutet darauf hin, daß die Protozoen-Theorie, wenn auch nicht direkt unrichtig, so doch nicht völlig zutreffend ist.

Versuche mit Gartenboden und Vegetationsversuche.

Da aus den Lehmbodenversuchen hervorging, daß in den geimpften Bodenproben durch Einführung von Mikroorganismen eine Änderung des Stickstoffumsatzes stattfand, besonders am Anfang der Versuche, wurden Versuche in größerem Maßstabe angestellt. Es war denkbar, daß die eingeführten Protisten nur eine kurze Zeit im Boden wirksam wären und dann infolge der neuen Lebensbedingungen sich encystierten oder abstürben. Das konnte aber nicht entschieden werden,

da eine geeignete Methode zur direkten qualitativen und quantitativen Bestimmung der Mikrofauna des Bodens zur Zeit der Lehmbodenversuche noch nicht bestand. Es war auch nicht ausgeschlossen, daß andere Faktoren wie die Protisten die beobachteten Änderungen des Stickstoffumsatzes verursacht haben. Es könnte z. B. die Zuführung von Bakterien oder anderen Mikroorganismen oder auch chemischen Verbindungen usw., die in dem zugesetzten Infus vorhanden waren, die erwähnten Änderungen hervorrufen.

Es erwies sich daher als notwendig, die unter „Methodik" angegebene Methode auszuarbeiten, die eine direkte Untersuchung des Bodenkleinlebens ermöglichte, oder ferner weitere Serien von Bodenproben anzulegen. Es wurden nun Versuche mit Gartenboden angestellt und 14 verschiedene Serien hergestellt, deren jede gewöhnlich 32 Bodenproben von je 200 g enthielt. Die 1. Serie erhielt, wie bei den Lehmbodenversuchen, nur Wasserzusatz in der für diese Bodenart optimalen Menge von etwa 23%.

Bei den Lehmbodenversuchen war beim Zusatz der Protozoen in einigen Fällen anfänglich eine Hemmung der Ammonifikation und Nitrifikation zu beobachten. Um die Frage klarzustellen, ob nicht das zugesetzte Heuinfus an und für sich die Ursache dieser Hemmung bildete, wurden die Proben der 2. Serie mit 1% sterilem Heuinfus versetzt.

Die Bodenproben der 3. Serie wurden mit 3 ccm Toluol je 100 g des Bodens, die der 4. mit 17,5 ccm Toluol, der Sättigungsmenge, behandelt.

Die 5. Serie wurde bei 75° C partiell sterilisiert. Die Proben der 6. Serie wurden im Autoklaven bei 1 Atmosphäre Überdruck während 3 Stunden erhitzt. In den Serien 7, 8 und 9 wurde die Wasserstoffionenkonzentration geändert. In den Serien 7 und 8 wurde der p_H-Wert von etwa 6,5 auf bzw. 5,0 und 6,0 herabgesetzt, in Serie 9 auf 8,0 erhöht.

Um zu ermitteln, welche Einwirkung ein schwacher Zusatz von Schwefelsäure auf das Kleinleben und den Stoffwechsel im Boden ausübt, wurde die Serie 10 hergestellt, die einen Zusatz von nur 1% n/10 H_2SO_4 erhielt.

Der Stickstoffgehalt wurde in den Bodenproben der 11. Serie um 30 mg je 1 kg erhöht.

In den Serien 12, 13 und 14 wurde schließlich eine Änderung sowohl des p_H-Wertes als auch des Stickstoffgehalts vorgenommen.

Die Änderung der Protozoenanzahl wurde in der Hälfte der Proben jeder Serie vorgenommen. Hierbei wurde das Impfmaterial aus den entsprechenden Serien erhalten mit Ausnahme der Serie 6, bei der Kontrollboden genommen wurde. Auch hier gestaltete sich die Entwicklung der Protozoen und anderer Mikroorganismen in den Aufschlämmungen verschieden. Einige Aufschlämmungen zeigten z. B. kleine *Ziliaten*, andere kleine *Flagellaten*, wieder andere große *Ziliaten* oder große *Flagellaten* usw. *Colpoda* war die am meisten verbreitete Ziliate und kam in sämtlichen Bodenaufschlämmungen vor mit Ausnahme derjenigen, welche mit partiell sterilisiertem Boden geimpft waren. Danach folgte *Colpidium*, das sich in Aufschlämmungen entwickelte, die mit dem Kontrollboden und mit Boden, dessen p_H zu bzw. 6,0 und 8,0 geändert war, geimpft wurden. *Oxytricha* wurde in Aufschlämmungen, die von Boden mit Stickstoffzusatz hergestellt waren, beobachtet, *Vorticella* in Infusen, die mit Boden versetzt waren, dessen p_H zu 6,0 geändert war, und *Stylonychia* bei Impfung mit dem Kontrollboden.

Nach etwa 14 Tagen wurden 2 ccm der entsprechenden Aufschlämmungen den Bodenproben zugeführt, mit Ausnahme derjenigen der Serie 10, die mit einer Mischung von verschiedenen Aufschlämmungen geimpft waren, um Bodenproben zu erhalten, denen verschiedenartige Protozoen zugesetzt waren.

Über ein Jahr hindurch wurden dann regelmäßige Bestimmungen von Ammoniak- und Salpeterstickstoff, Wassergehalt, Wasserstoffionenkonzentration, Mikrofauna und Mikroflora ausgeführt.

Der Wassergehalt und die Wasserstoffionenkonzentration haben bei diesen Versuchen mit sehr wenigen Ausnahmen keine größeren Veränderungen erfahren und können deshalb, wie auch die Temperatur, als konstante Faktoren angesehen werden. Die Ammoniak- und Salpetermenge war dagegen sehr starken Veränderungen unterworfen, welche die des Lehmbodens bedeutend übertrafen. Da diese Untersuchungen zum großen Teil schon in Mitteilungen der Zentralanstalt veröffentlicht sind (203)[1], werden wir uns hier hauptsächlich bei dem Vergleich zwischen dem Stoffumsatz im Lehm- und Gartenboden aufhalten.

Im normalen Gartenboden (Serie 1) wurde, ähnlich den Verhältnissen im Lehmboden, das gebildete Ammoniak unmittelbar in Salpeter und Eiweiß umgewandelt[2].

Ein Zusatz von 2 ccm 1 %igem, sterilem Heuinfus (Serie 2) verursachte in den ungeimpften wie auch geimpften Bodenproben ein schnelles Sinken der Salpeterstickstoffmenge[3]. Durch Zusatz von Heuinfus wurden den Bodenproben wasserlösliche Kohlenhydrate usw. zugeführt, was den kohlenhydratvergärenden Mikroorganismen Möglichkeiten zur Entwicklung bot, die dann den Salpeterstickstoff verbrauchen. Nach dem Verbrauch der zugesetzten organischen Substanz, nach etwa 1 Monat, ist dann der Verlauf der Nitrifikation in dieser Serie ungefähr derselbe wie in der Kontrollserie. Eine Hemmung der Nitratbildung in den geimpften Bodenproben dieser Serie konnte während der ganzen Versuchszeit nicht beobachtet werden. Hieraus kann man den Schluß ziehen, daß die bei Zugabe von Protozoen beobachtete Hemmung im Stickstoffumsatz nicht so sehr den Protozoen zugeschrieben werden muß wie dem Infus.

Die Behandlung der Bodenproben mit 3 % Toluol hat auch im Gartenboden wie im Lehmboden höchst eigentümlich auf die Ammoniak- und Salpeterbildung gewirkt[4], im Gartenboden jedoch bedeutend stärker als im Lehmboden. Die Hemmung der Ammonifikation durch die Protozoen ist ebenso unbedeutend wie ihre günstige Einwirkung auf die Nitrifikation.

Die Einwirkung des Toluols wird noch ausgeprägter, wenn die Toluolmenge auf 17,5 % vermehrt wird (Serie 4)[5]. Hemmung der Ammonifikation und Beschleunigung der Nitrifikation in den geimpften Bodenproben konnte auch hier festgestellt werden. Obwohl der Ausschlag des Protozoenzusatzes in dieser Serie etwas größer als in der mit 3 % Toluol behandelten war, so ist er doch allzu klein, um in ihm eine Bestätigung der Protozoen-Theorie erblicken zu können.

[1] Beim Hinweis auf diese Arbeit (in schwedischer Sprache) wird sie späterhin „Mitteilungen" genannt. — [2] „Mitteilungen" Tabelle S. 30 und Abbildung S. 31. — [3] „Mitteilungen" Tabelle und Abbildung S. 32. — [4] „Mitteilungen" Tabelle und Abbildung S. 33. — [5] „Mitteilungen" Tabelle und Abbildung S. 34.

Erhitzung auf 75° C (Serie 5)[1] verursachte im Gartenboden eine stärkere Ammonifikation als im Lehmboden. Die Nitrifikation verlief hier wie in toluolbehandelten Serien umgekehrt wie die Ammonifikation; jene verschwand im Boden durch die Behandlung nicht vollständig, sondern wurde nur während einer kürzeren oder längeren Zeit gehemmt. Der Zusatz von Protozoen hat keinen merkbaren Einfluß auf den Stoffwechsel in dieser Serie ausgeübt.

In den bei 120° C behandelten Bodenproben (Serie 6)[2] erfolgt die Ammonifikation, wie bei entsprechenden Versuchen mit Lehmboden, im ungeimpften Teil bedeutend schwächer als im geimpften.

Die zu Anfang sehr schwache Nitrifikation kam nach $8^1/_2$ Monaten in Gang, merkwürdigerweise gleichzeitig mit einer starken Steigerung der Ammonifikation, so daß sich eine auffallend große Gesamtmenge von löslichem Stickstoff ergab. Aus der Vermehrung der Stickstoffmenge im Verlauf des Versuchs in dem ungeimpften Teil und dem Vorkommen von Mikroorganismen in den Präparaten ging hervor, daß die Serie nicht, wie beabsichtigt, totalsterilisiert war. Das etwa dreistündige Erhitzen des Bodens auf 120° C war also nicht ausreichend zur völligen Sterilisierung. Schon die entsprechende Serie der Lehmbodenversuche (siehe Serie 5 der Lehmbodenversuche) gab infolge der Schwankung der Stickstoffmengen Anlaß zu der Vermutung, daß die Serie nicht steril war, aber erst bei den Versuchen mit Gartenboden erhielt man den sicheren Beweis für die Unzulänglichkeit der Behandlung.

Da eine völlig sterilisierte Bodenserie für die vorliegende Frage von großer Bedeutung zu sein schien, wurde eine solche durch Verminderung der Bodenmenge auf 50 g, Verlängerung der Behandlungszeit auf 5 Stunden und Einführung von *Freudenreich*-Kolben zustandegebracht (Serie 6A). Die totalsterilisierten Bodenproben[3] zeigten viel Ammoniakstickstoff, was natürlich nicht auf Mikroorganismen beruhte, die hier vollständig fehlten, sondern auf der durch das Erhitzen hervorgerufenen Zersetzung der organischen Substanz. Dementsprechend blieb der Gehalt an Ammoniak- und Salpeterstickstoff in diesen Bodengruppen während der ganzen Versuchszeit unverändert. Dort, wo Mikroorganismen mit 1% Heuinfus eingeführt wurden[4], stieg während der ersten 2 Wochen die Ammoniakmenge sehr stark, die Salpetermenge dagegen, die durch Zusatz von Infus zu Anfang bis auf Null herunterging, nur unbedeutend. In den folgenden 2 Wochen begann die Ammoniakmenge langsam zu sinken, während die Salpetermenge auffallend schnell stieg. Später behalten Ammonifikation und Nitrifikation die eingeschlagene Richtung in viel schnellerem Tempo bei. Nach $^1/_2$ Jahr zeigte diese Serie eine höchst bedeutende Gesamtmenge löslichen Stickstoffs. Die Wirkung der zugesetzten Protozoen darf nach den Analysen als günstig betrachtet werden.

Änderung des p_H der Bodenproben von etwa 6,5 (1. Serie) auf etwa 5,0 bzw. 6,0 oder auch 8,0 (die Serien 7, 8 und 9) wirkte nur unbedeutend auf die Ammonifikation und Nitrifikation[5]. Zum Unterschied vom Lehmboden konnte im Gartenboden kein Ammoniakstickstoff nach der p_H-Änderung

[1] „Mitteilungen" Tabelle und Abbildung S. 36. — [2] „Mitteilungen" Tabelle S. 37 und Abbildung S. 38. — [3] „Mitteilungen" A und B in Tabelle S. 39 und 40 und Abbildung S. 41. — [4] „Mitteilungen" C in Tabelle S. 39 und 40 und Abbildung S. 41. — [5] „Mitteilungen" Tabelle und Abbildung S. 42, 43 und 44.

nachgewiesen werden. Auch die Nitrifikation weicht in diesem Gartenboden etwas von der im Lehmboden ab: In diesem hatten die geimpften Teile der Serie etwas mehr Salpeterstickstoff als die ungeimpften; der Gartenboden dagegen hatte ungefähr den gleichen Gehalt an Salpeter in den geimpften und ungeimpften Teilen der erwähnten drei Serien.

Serie 10, welcher nur gerade so viel Schwefelsäure zugesetzt wurde, daß keine p_H-Änderung zustande kam[1], deutet darauf hin, daß Schwefelsäure an und für sich einen gewissen hemmenden Einfluß auf die Nitrifikation ausübt. Der geimpfte Teil dieser Serie ist noch dadurch von Interesse, daß hier das Impfmaterial eine Mischung von Protozoen und Cysten aus allen Serien enthält. Keine der zugesetzten Protozoenarten oder Cysten hat sich jedoch in solchem Grade entwickeln können, daß eine hemmende Wirkung auf die Nitrifikation zustande kommen konnte.

Serie 11 zeigte[2], daß, wie im Lehm-, so auch im Gartenboden ein Zusatz von Ammoniumsalz die Nitrifikation stimuliert, aber im Gartenboden erfolgte die Oxydation des zugesetzten Ammoniakstickstoffs schneller, kräftiger und vollständiger als im Lehmboden, wo Ammoniak während der ganzen Zeit des Versuchs nicht vollständig verschwand.

Wenn gleichzeitig mit dem Zusatz des Ammoniumsalzes auch das p_H von etwa 6,5 auf etwa 5,0 (Serie 12) oder 6,0 (Serie 13) herabgesetzt oder auf etwa 8,0 (Serie 14) erhöht wurde, so war die Salpeterstickstoffmenge in den drei Serien mit geändertem p_H niedriger als in Serie 11, deren p_H nicht geändert wurde[3]. Eine Änderung des p_H mittels Schwefelsäure hemmt also die Nitrifikation. Die Oxydation des zugesetzten Ammoniakstickstoffs zu Salpeter wurde durch Ansäuern oder Alkalisieren des Bodens zwar nicht verhindert, aber die in Serie 11 beobachtete Stimulation der Salpeterbildung ist in den Serien 12 bis 14 ausgeblieben. Die starke Hemmung, die die saure Reaktion im Lehmboden ausübte, konnte im Gartenboden nicht wahrgenommen werden.

Die Ergebnisse des Protozoenzusatzes ließen in diesen Serien keinen Schluß auf eine hemmende oder günstige Wirkung dieser Organismen zu.

Um die erhaltenen Ergebnisse in größerem Maßstabe prüfen zu können und auch den Verhältnissen in der Natur näher zu kommen, wurden Vegetationsversuche mit Hafer in irdenen Töpfen, die 5 kg Erde faßten, ausgeführt. Es wurden zwölf Topfe verwendet, von welchen sechs mit sterilisiertem und sechs mit nichtsterilisiertem Boden gefüllt wurden. Die Hälfte jeder Serie, d. h. drei Töpfe, wurden geimpft.

Nach beendeter Vegetationsperiode ergab der Hafer des sterilisierten Bodens eine etwa zweimal so hohe Ernte wie der Hafer des nichtsterilisierten Bodens. Der Boden in den Töpfen zeigte relativ unbedeutende Mengen von Ammoniak- und Salpeterstickstoff in dem nichtsterilisierten und so gut wie gar keine in dem sterilisierten Boden. Der Hafer hat also sowohl Ammoniak- als auch Salpeterstickstoff aus dem Boden aufgenommen. Da der sterilisierte Boden zu Anfang des Versuchs einen vielfach größeren Gehalt an Stickstoff in Form von Ammoniak und Salpeter hatte als der unbehandelte, muß man annehmen, daß die Pflanzen aus einem oder dem anderen Grunde die Nährstoffe im sterilisierten Boden vollständiger auszunutzen imstande sind als im nichtsterilisierten.

---

[1] „Mitteilungen" Tabelle und Abbildung S. 45. — [2] „Mitteilungen" Tabelle S. 46 und Abbildung S. 47. — [3] „Mitteilungen" Tabelle und Abbildung S. 48, 49 und 50.

Nach den periodischen Untersuchungen der Mikrofauna zu schließen, war der Einfluß der zugesetzten Protozoen auf die Verminderung oder Steigerung der Ernte so unbedeutend, daß ein Einfluß der Mikrofauna nicht festzustellen war.

Die Mikrofauna des Bodens. Ihre Stellung zur Bodenmikroflora.

In der *Bodenmikrofauna* sind nach den Bodenprotozoen-Forschern drei der fünf bekannten Protozoenklassen, die wir aus dem Süßwasser kennen, *Rhizopoden*, *Flagellaten* und *Ziliaten*, reichlich vertreten. Von den bis heute identifizierten Arten (über 300) sind aber nur 21 aus Süß- oder Meerwasser nicht bekannt und daher als echte Bodenprotozoen anzusehen, während dann über 90 % der Protozoen des Bodens gewöhnliche aquatische Protisten wären, darunter auch die größten bekannten Formen wie z. B. *Pelomyxa palustris*, die 2000 μ im Durchmesser und mehrere tausend μ, ja sogar bis zu 15 mm Länge mißt.

In einer früheren Arbeit (200) wurde gezeigt, daß die Mikrofauna, die sich bei Impfung von Infusen auf künstlichen Substraten mit Boden entwickelt, von den physiologischen Bedingungen des Mediums abhängig war. Deshalb konnte man bei Impfung einer und derselben Probe ganz verschiedene Protozoen erhalten, wenn man verschiedene Substrate benutzte oder die Konzentration, Temperatur usw. eines und desselben Substrats veränderte. Außerdem war zu erwarten, daß auch durch Ausschlüpfen der Protozoen aus den im Boden vorkommenden Cysten aquatischer Protozoen, die bei geeigneten Bedingungen des Substrats sich zu entsprechenden aktiven Formen zu entwickeln imstande waren, die Ergebnisse beeinflußt werden konnten. Als Folge einer solchen Bodenimpfung konnte eine Mikrofauna erhalten werden, die nach ihrer Zusammensetzung der gewöhnlichen aquatischen gleichen würde.

Die Zahl der Protozoen im Boden schwankt nach den vorhandenen Angaben sehr stark: von etwa 10000 bis 100000 und sogar mehrere Millionen je 1 g (69, 134, 169, 233, 316, 340, 357, 368, 381). Die *Flagellaten* sollen der Menge nach dominieren, dann die *Rhizopoden* und endlich die *Ziliaten* folgen. Indessen kann in gewissen Böden auch eine andere Reihenfolge beobachtet werden, so dominieren im Waldboden die *Amoeben* (109), in sauren Torfböden *Thecamoeben* (339), in Alpengegenden *Ziliaten* (111) usw. Nach einigen Forschern sollen Jahreszeit oder Bodenart usw. stark auf die Zahl einwirken, nach anderen (77, 339) aber soll die Protozoenzahl nicht nur während verschiedener Jahreszeiten, sondern auch von einem Tag zum anderen wechseln und von Temperatur, Feuchtigkeit, Regen usw. unabhängig sein. Ein Maximum wurde von einigen Forschern (120, 226, 227, 400) während des Sommers und ein Minimum während des Winters beobachtet, während nach anderen Beobachtungen (109) die Anzahl Protozoen im Sommer bedeutend niedriger sei als im Winter. Von Interesse ist, daß auch in gefrorenem Boden etwa 2600 *Flagellaten*, 13000 *Rhizopoden* und über 100 *Ziliaten* gefunden wurden (340).

Die meisten Arbeiten stimmen in bezug auf den Einfluß der physikalischen und physiologischen Beschaffenheit des Bodens in folgenden Schlüssen überein: Feinkörniger Boden enthält mehr Protozoen als grobkörniger Boden (69). Sandboden ist verhältnismäßig arm an Protozoen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Protozoen ist indessen im Sande viel größer als im Lehmboden (237, 238). Verschiedene Bodentypen sollen nach einigen Angaben (120) durch besondere Protozoen gekennzeichnet sein. Die Feuchtigkeit wurde als einer der wichtigsten Faktoren befunden, wobei die Anzahl Protozoen mit dem Wassergehalt des Bodens zunahm (110, 120, 197, 379). Kultivierte Böden, die reich an organischen Stoffen sind, enthalten mehr Protozoen als nicht kultivierte (105, 198, 381, 422). Stark saure oder alkalische Böden sind protozoenarmer als solche, deren p_H-Wert näher dem Neutralpunkt liegt (121, 400). Die Zahl der Protozoen ist auch von der Höhenlage des Bodens über der Meeresfläche und der Tiefe unter der Erdoberfläche (120, 121, 381) abhängig, indem sie gewohnlich mit zunehmender Hohe und mit zunehmender Tiefe abnimmt.

Um die qualitative und quantitative Bestimmung der Protozoen bei den indirekten Methoden zu erleichtern, wurden viele Hilfsmittel vorgeschlagen, wie Standardose (196), Agarplattenmethode (192), Verdünnung (316), die auch bei bakteriologischen Arbeiten verwendet werden, ferner Vitalfarbung (184, 209), Filter (210), Blutkorperzahlapparat (209, 211, 212, 214) usw.

Auch Veranderungen in Stoffwechselprodukten sind als Indikatoren für die Bestimmung der relativen Zahl oder die Wirksamkeit der Protozoen und anderer Mikroorganismen benutzt worden. Indessen können weder Kohlensaure- (76), noch Sauerstoff- (79, 80, 324) oder Stickstoffbestimmung (170, 317), die versucht wurden, ein Bild von der Mikrofauna oder Mikroflora des Bodens geben, sondern bestenfalls eine Vorstellung von der Fruchtbarkeit des Bodens. Ein Vergleich zwischen der Stoffumsatzmethode und den anderen indirekten Methoden gab nicht immer übereinstimmende Werte (112, 405). Die indirekten Methoden haben keine allgemeinere Anwendung gefunden, und mehrere Forscher (66, 192, 205) finden den Wert dieser Methoden sehr gering. Die einzige indirekte Methode, die eine großere Rolle spielte und auch jetzt noch von vielen Forschern benutzt wird, ist die von *Cutler* (68, 69) und seiner Schule ausgearbeitete.

Es ist auch zu bedenken, daß verschiedene Protozoenklassen und sogar -arten auch von verschiedener Bedeutung hinsichtlich der Bakteriendezimierung sind, da bei vielen Protozoen ein Unterscheidungsvermögen hinsichtlich der Nahrung besteht (75, 125, 163, 236, 354). Eine Vermehrung der Zahl der *Amoeben* und eine Verminderung der Zahl der Bakterien, d. h. ein entgegengesetztes Verhalten dieser Mikroorganismen, aber nicht von *Flagellaten* und Bakterien, konnte von einigen (73, 77) beobachtet werden. Nach anderen (373) sollen aber die *Flagellaten* eine großere Rolle im Stoffwechsel des Bodens spielen als die *Rhizopoden* und *Ziliaten*.

Wenn wir in Übereinstimmung mit den meisten Forschern einmal annehmen, daß sich im Durchschnitt etwa 50000 *Rhizopoden*, 100000 *Flagellaten* und 1000 *Ziliaten* in 1 g Boden befinden, so dürfte diese Menge von über 150000 Protozoen ein bedeutendes Volumen je 1 g Boden einnehmen, da die *Rhizopoden* und *Ziliaten* schätzungsweise im Durchschnitt 100 μ an Länge und 50 μ im Durchmesser messen und die *Flagellaten* Kugeln mit 10 μ Durchmesser bilden. Der Einfluß dieser Protozoen auf die Bakterienmenge würde unbestreitbar groß sein, wenn sie sich als Bak-

terienfresser in demselben Grade wie die aquatischen Formen in Infusen betätigten. Der Orientierung halber sei noch mitgeteilt, daß das Volumen von 1 Milliarde Bakterien auf etwa 1 cmm berechnet wird. Das Volumen eines *Paramaecium* beträgt dagegen etwa 0,0007 cmm (190). Wir können deshalb annehmen, daß das durchschnittliche Volumen der Protozoen, die sich in 1 g Boden befinden sollen, etwa 36 cmm betragen würde. Dies ist kein unbedeutender Teil der Bodenmasse, wenn man bedenkt, daß außer den Protozoen noch die ungeheure Masse anderer Mikroorganismen zwischen den Bodenpartikeln Platz finden muß.

Die unbefriedigenden Ergebnisse der indirekten Methoden veranlaßten viele Forscher, direkte Methoden zur Untersuchung der Bodenmikrofauna auszuarbeiten. Zieht man aber in Betracht, daß die Bodenpartikeln undurchsichtig sind, daß viele Bodenprotozoen kleiner sind als die Bodenpartikeln und oft an diesen fest anhaften, so wird es klar, daß ihre Auffindung ohne technische Hilfsmittel unmoglich ist. Die direkten Methoden, die ausgearbeitet worden sind (85, 120, 121, 130, 196, 197, 237, 238, 249 bis 251, 255, 333), waren so unbefriedigend, daß sie keine größere Verwendung fanden und durch indirekte Methoden ersetzt wurden.

Wir werden nun die Ergebnisse der Untersuchung des Kleinlebens im Boden besprechen, die mit der vom Verfasser ausgearbeiteten direkten Methode erhalten wurden. Da wir mit dieser Methode Bodenaufschlämmung von $^{1}/_{20}$ Verdunnung unter dem Mikroskop auch bei starker Vergrößerung untersuchen und unter einem Deckglas von 24 × 40 mm mehr als 0,2 ccm der Aufschlämmung aufnehmen können, müßten wir mit Rücksicht auf die früher angegebene Anzahl Protozoen, die mit den indirekten Methoden erhalten wurden, im Präparat etwa 500 Rhizopoden, 1000 Flagellaten und 10 Ziliaten finden. Bei einer solchen Menge Protozoen würde man nicht nur in gefärbten, sondern auch in ungefärbten Präparaten viele entdecken können. Die Leistungsfähigkeit der Methode zeigen die Mikrophotographien der Abb. 13, die von verschiedenen Bodenaufschlämmungen bei jeweils verschiedenen Verdünnungen und Vergrößerungen aufgenommen sind. Die Bodenmikrofauna kann also nicht nur in fixierten, sondern auch in nichtfixierten Präparaten untersucht werden, weil die Protozoen aus Bodenaufschlämmungen ebenso gut wiedergegeben werden wie Protozoen aus flüssigem Medium (siehe z. B. *a*, *b*, *c*, *g* und *h* der Abb. 13, S. 272).

Wie bereits mitgeteilt wurde, hat sich nach einigen Tagen eine in quantitativer und qualitativer Hinsicht verschiedene Mikrofauna in den jeweiligen Bodenaufschlämmungen, mit welchen die Impfung der Bodenproben in den verschiedenen Serien vorgenommen wurde, entwickelt. Diese Formen konnten jedoch bei direkter Untersuchung der Bodenproben nicht beobachtet werden. Bei den periodischen Untersuchungen wurden in den Bodenproben überhaupt keine großen aktiven Protozoen gefunden, sondern nur kleine Protistenformen. Auch in den 5-kg-Töpfen der Vegetationsversuche, die im Versuchshaus standen und der Infektion von verschiedenen Cysten und Protozoen ausgesetzt

waren, konnten während der Vegetationsperiode nur kleine Bodenprotozoen gefunden werden. Dies zeigt, daß die großen Formen in normalem Boden nicht leben können: Entweder sterben sie ab oder werden erst durch eine starke Verwandlung, die sie zur Unkenntlichkeit bringt, instand gesetzt, ein aktives Leben im Boden zu führen. Einige der gefundenen Bodenprotozoen sind auf der Abb. 13 (siehe *d*, *e* und *f*) wiedergegeben. Das Vorhandensein der Pseudopodien, Flagellen, Zilien, Kerne usw. zeigt, daß eine eigentliche Bodenmikrofauna vorhanden ist, weil die Methode eine Entwicklung von fremden Protozoen ausschließt.

Diese Bodenmikrofauna unterscheidet sich jedoch sehr stark von der, die durch indirekte Untersuchung erhalten wird. Auch die Formen, die leicht die Gestalt der aquatischen Formen wiedererkennen lassen, sind bedeutend kleiner als diese, so daß wir von „Liliputformen" sprechen können. Die Länge eines gewöhnlichen aquatischen *Chilodon* kann zwar sehr stark schwanken, beträgt aber im Durchschnitt etwa 150 μ. Die größte *Ziliate*, die ich in meinen Präparaten gefunden habe (siehe *f* der Abb. 13) maß nur etwa 22 μ. Andere *Ziliaten*, die ihre spezifischen Eigenschaften erkennen ließen, wurden in den untersuchten Bodenproben nicht gefunden, auch nicht in den Serien der Gartenbodenversuche, wo bei Impfung viele aktive *Ziliaten* und *Ziliaten*-Cysten zugesetzt wurden Dies zeigt, daß sowohl die zugesetzten aktiven *Ziliaten*-Formen als auch ihre Cysten nicht imstande sind, sich im Boden bei normalen Feuchtigkeitsverhältnissen zu entwickeln, oder daß sie bei ihrer Entwicklung im Boden durchgreifende Veränderungen erleiden, bei welchen Zilien und andere Kennzeichen nur schwierig zu erkennen sind. *Ziliaten*-Cysten kamen indessen regelmäßig in Bodenproben vor. Dies ging auch aus der Entwicklung der *Ziliaten* (welche oft sogar die dominierende Gruppe bildeten) bei Impfung verschiedener flüssiger Substrate mit Bodenproben hervor.

Bei den *Rhizopoden* finden wir ähnliche Verhältnisse (siehe *d* der Abb. 13). Im Boden werden sowohl beschalte (*Thecamoeben*) wie unbeschalte Formen mit dieser Methode angetroffen. Von jenen kamen in den untersuchten Bodenformen u. a. *Difflugia*, *Arcella* und *Trinema* vor[1].

Den unbestreitbar größten Teil der wirklichen Bodenprotozoen bilden jedoch, wenigstens was die untersuchten Böden anbelangt, die *Flagellaten*. Sie kommen in mehr oder weniger großer Individuenzahl vor und bilden also den vorherrschenden Teil der Mikrofauna des Bodens. Ein Teil der gefundenen *Flagellaten* gleicht *Monas*,

[1] Mehrere Bodenprotozoen sind auf der Tafel II der „Mitteilungen' wiedergegeben.

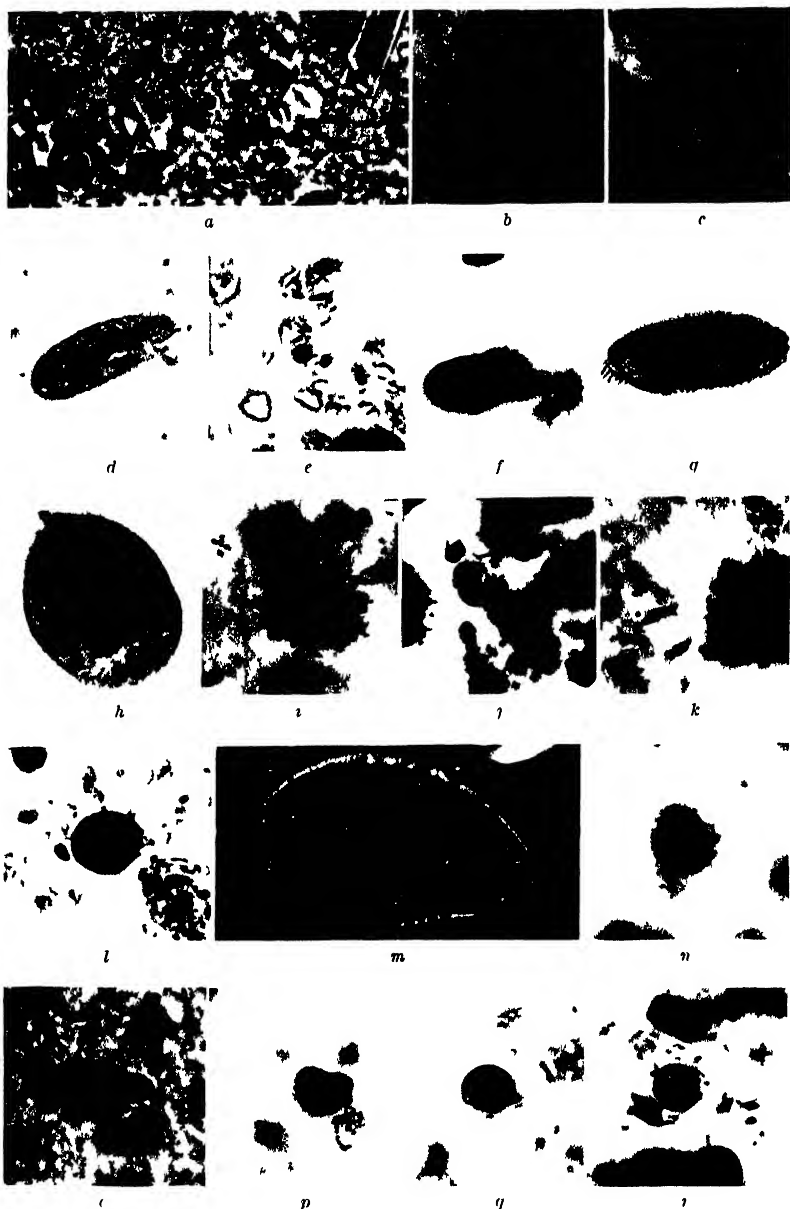


Abb 13

a Nicht fixierte Bodenaufschlämmung neu hergestellt nicht gefärbt Auf dem Bilde sieht man u a eine Cyste und eine Diatomee Vergr etwa 900 1

b Ziliaten aus einer 3 Tage alten Bodenaufschlämmung Erythrosinfärbung Vergr etwa 55 1

c *Euglypha*, in Teilung aus viele Tage alter Bodenaufschlämmung Cyanosinfärbung Vergr etwa 700 1

d *Trinema* aus Bodenprobe. Erythrosinfärbung. Vergr. etwa 700 : 1.
e *Bodo ovatus* aus Bodenprobe Cyanosinfärbung. Vergr. etwa 700 : 1
f *Chilodon* aus Bodenprobe. Cyanosinfärbung. Vergr. etwa 700 : 1.
g *Gastrostyla steinii* aus einem alten Infus. Hämalaunfärbung. Vergr. etwa 400 : 1.
h *Glaucoma scintillans* aus einem Aquarium. Hämalaunfärbung. Vergr. etwa 400 : 1.
i Mikrokokken aus Bodenprobe. Cyanosinfärbung. Vergr etwa 700 : 1.
j *Crucigenia* aus Bodenprobe. Cyanosinfärbung Vergr. etwa 700 : 1.
k Cyste und Mikrokokken aus Dünger. Cyanosinfärbung. Vergr. etwa 700 1.
l *Arcella vulgaris* aus Bodenproben mit 15% Wassergehalt. Cyanosinfärbung. Vergr. etwa 700 : 1.
m *Colpoda cucullus* aus Infusschicht der gesättigten Bodenproben. Fixierung mit *Lugols* Losung. Vergr. 700 : 1.
n bis *r* Die gleiche Art aus Bodenproben der Serien mit vermindertem Feuchtigkeitsgehalt. Cyanosinfärbung Vergr. etwa 700 : 1.

Oicomonas, *Bodo* usw., obwohl sie, wie die früher besprochenen *Ziliaten* und *Rhizopoden*, auffallend klein sind (siehe *e* der Abb. 13). Wenn nicht ihr Kern und typisches Flagellum sichtbar wäre, würde man annehmen können, daß sie einem großen Bakterientypus angehörten. Die Existenz von aktiven Protozoen konnte in allen Serien mit Ausnahme der ganz sterilisierten Bodenproben der Serie 6 A der Gartenbodenversuche mit dieser Methode festgestellt werden. Die partielle Sterilisierung des Bodens bewirkt also keine vollständige Vertilgung der Protozoen, sonst würden die Bodenproben nach der Behandlung mit so großen Mengen antiseptischer Mittel, daß der Boden gesättigt war (z. B. Serie 4 der Gartenbodenversuche mit 17,5% Toluol), oder einer Erhitzung auf 75° C und besonders auf 120° C keine Mikroorganismen aufweisen können.

Von der Benennung einiger bisher anscheinend noch nicht beschriebenen Arten sowie auch von einer näheren Systematik der wirklichen Bodenprotozoen wurde vorläufig abgesehen, da diese Formen zum ersten Male angegeben sind. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß Cysten von echten Bodenprotozoen sich auf bzw. in den üblichen künstlichen Nährsubstraten auf Grund geringer Entwicklungsfähigkeit oder langsamen Wachstums nicht erfassen lassen. Es war ferner anzunehmen, daß wir es im Boden mit Modifikationen aquatischer Formen zu tun hatten, die durch Anpassung an das Leben im Boden hervorgerufen waren. Es kann sich aber auch um besondere Formen handeln, die nur im Boden vorkommen. Die besprochene direkte Methode zeigt jedenfalls, daß die Vertreter der Bodenmikrofauna sich sehr stark von den aquatischen Protisten unterscheiden, und dies ist von entscheidender Bedeutung für die Beantwortung der Frage nach der Rolle der Protozoen im Boden. Man hat also triftige Gründe anzunehmen, daß die Protozoenformen, die sich in künstlichen Substraten gewöhnlich entwickeln, nicht Bodenprotisten sind. Da kleine Protisten gar nicht so viel Bakterien aufzunehmen imstande sind wie große Formen, können also die Bodenprotisten auf die Bakterienzahl kaum einen Einfluß ausüben.

Ihr Einfluß auf den Stoffumsatz im Boden würde deshalb unbedeutend sein, was mit den Ergebnissen der Stoffumsatzanalyse im guten Einklang steht.

Die Winzigkeit der eigentlichen Bodenprotisten erscheint natürlich, da sie Vorteile für eine aktive Lebensweise im Boden darbietet. Die kleinen Zwischenräume zwischen den Bodenpartikeln, die geringe Feuchtigkeit des normalen Bodens, die Verteilung der Nährsalze auf unregelmäßige Schichten, die scharfen Ränder der harten Partikeln usw. müssen für die großen Protozoen unüberwindliche Schwierigkeiten bei der Fortbewegung und bei der Beschaffung der Nahrung und für eine aktive Lebensweise überhaupt bieten. Nur eine kleine Zahl Protozoen, wie *Amoeba proteus* (289) oder *A. terricola* (160), ist imstande, Verletzungen der Pellicula leicht zu heilen. Der überwiegende Teil der Protozoen, besonders der *Ziliaten*-Formen, ist dagegen sehr empfindlich gegen Beschädigungen.

Wie schon erwähnt, wird das Vorkommen von aktiven Protozoen im normalen Boden von einigen Forschern in Abrede gestellt. Mit der Methode des Verfassers können wir jedoch den vollgultigen Beweis dafür geben, daß aktive Protozoen im Boden bei normalen Bedingungen vorkommen. In bezug auf die Anzahl Protozoen unterscheiden sich die mit dieser Methode erhaltenen Ergebnisse bedeutend von denen der anderen Methoden. Die Protozoenzahl war geringer in den Bodenproben der angesäuerten und partiell sterilisierten Serien als in der unbehandelten Serie und schwankte während der verschiedenen periodisch ausgefuhrten Bestimmungen, konnte aber in gunstigen Fällen etwa 50000 pro 1 g Boden erreichen. Diese Zahl ist jedoch, wie wir später bei direktem Studium der Bodenmikroflora sehen werden, verschwindend klein im Vergleich zu den übrigen Bodenmikroorganismen. Die Cysten, sowohl große als kleine, kamen dagegen allgemeiner verbreitet vor, in Bodenproben der unbehandelten Serie konnten z. B. uber 26000 große und 63000 kleine Cysten je 1 g gezählt werden.

Auch die *Mikroflora des Bodens* wird in vielen Arbeiten behandelt, die sich jedoch bis in die letzten 10 bis 15 Jahre ausschließlich auf indirekte Untersuchungen stützten. Möglicherweise bestehen aber hier, wie bei den Protozoen, große Unterschiede zwischen den wirklich im Boden vorhandenen und den in oder auf verschiedenen Substraten sich entwickelnden Formen. Auch mag es Bodenmikroorganismen geben, die man bei der Unzweckmäßigkeit der indirekten Methoden noch nicht hat isolieren können. Ferner wäre es möglich, daß Bakterien oder andere Mikroorganismen an den Bodenpartikeln stark anhaften und dadurch bei der Herstellung von Verdünnungen und bei der Impfung verloren gehen. Es fehlt nicht an Forschern (60, 113), die darauf aufmerksam

machen, daß wir trotz des Reichtums an Untersuchungen sehr wenig von der wirklichen Bodenmikroflora wissen.

Die vorliegenden direkten Methoden (12, 42, 60 bis 63, 138, 218, 219, 322, 323, 378, 401 bis 404) haben den Nachteil, daß bei ihnen „Trockenfixierung“ angewandt wird, ein Verfahren, bei dem die größeren Mikroorganismen zerstört werden[1]. Die vom Verfasser ausgearbeitete Methode ermöglicht eine morphologisch unveränderte Wiedergabe der Mikroflora und vermeidet die Fehler, die durch Entwicklung von Cysten und Sporen verursacht werden können. Wir können durch sie die verschiedenen Bakterien, Pilze und Algen in ihrer natürlichen Gestalt (siehe *i* und *j* der Abb. 13) ohne Störung durch die Bodenpartikeln beobachten. Die gefärbten Dauerpräparate und sogar auch die Präparate mit nichtfixierter oder fixierter Aufschlämmung bieten die Möglichkeit, einen Teil der Bodenmikroflora, besonders bei Anwendung der stärksten Vergrößerungen, zu untersuchen. Ferner kann diese Methode fur das Studium der Mikroflora und Mikrofauna vielseitige Anwendung finden, da sie nicht nur die Untersuchung des Kleinlebens im Boden, in Infusen usw., sondern auch im Dünger gestattet (siehe *k* dei Abb. 13), was bei anderen Methoden nicht möglich ist. Die Mikroflora ist im Boden sehr verbreitet. Es gibt kaum irgendwelche Bodenpartikeln in der Ackerkrume, die — nach Präparaten zu urteilen — frei von Mikroorganismen sind. Oft haften diese in Massen an mineralischen Bodenpartikeln oder organischen Substanzen. Auffallend ist das Vorkommen von hullenumgebenen Mikroorganismen, was damit zusammenhängen mag, daß diese Hüllen besondere Vorteile gewahren zwischen den harten oder scharfen Bodenpartikeln. Aus den Präparaten ergibt sich, daß wir es bei der Mikroflora des Bodens wie auch bei den Bodenprotozoen entweder mit durch Anpassung an das Leben im Boden hervorgerufenen Modifikationen oder mit besonderen Formen zu tun haben, die von den Mikroorganismen stark abweichen, die wir bei Impfung auf Agar usw. erhalten.

Freilich wird bei unserer Methode ein Teil der Mikroorganismen aus dem natürlichen Verbande herausgerissen, aber dies hindert nicht, daß durch sie die mit der Protozoen-Theorie zusammenhängenden Probleme gelöst werden können, da wir auf Präparaten gleichzeitig die Mikrofauna und die Mikroflora erhalten.

Von den verschiedenen Mikroorganismengruppen, wie sie auf Grund der Methode hervortraten, herrschen die Bakterien quantitativ und qualitativ vor. Die Zahl der großen Bakterien, darunter auch große,

[1] Darauf sei hier besonders aufmerksam gemacht, weil dies oft seitens der Bodenforscher übersehen wird.

an *Azotobacter* erinnernde Kokken, wird bedeutend von der der mittelgroßen Kokken von 1 bis 1,5 μ Durchmesser übertroffen, die nach ihrem Volumen als die vorherrschenden Bodenbewohner anzusehen sind. Eine sehr zahlreiche Gruppe bilden die kleinsten Kokken mit einem Durchmesser unter 1 μ, die allerdings ihrem Volumen nach einen verhältnismäßig kleinen Teil der Bakterienmasse ausmachen. Die Stäbchen bildeten in den untersuchten Bodenproben eine winzige Gruppe, obgleich sie an manchen Stellen in großen Massen auftraten. Die kleinen Stäbchen überwiegen aber an Individuen-, Artenzahl und auch Gesamt-Volumen über die größeren.

Die *Algen* bildeten in den untersuchten Bodenproben einen nicht unbedeutenden Teil der Bodenflora. *Cyanophyceen*, *Chlorophyceen* und *Diatomeen* wurden nicht nur in den oberen, sondern auch in ziemlich tiefen Bodenschichten gefunden, wo die Einwirkung der Sonnenstrahlen von ganz anderem Charakter sein muß als im Wasser.

Ein Teil der Algen spielt vielleicht eine gewisse Rolle bei der Stickstoffbindung im Boden (24, 87, 265, 348), während ein anderer für diese ohne Belang bleibt (27, 215, 264). Bei günstigen Bedingungen können die Algen dem Boden bedeutende Mengen organischer Stoffe zuführen oder durch Symbiose mit stickstoffbindenden Bakterien den Stickstoffgehalt des Bodens vermehren (26).

Die *Pilze* bilden einen sehr großen Teil der aktiven mikroskopischen Welt des Bodens. Ihre Hyphen werden sehr oft in Präparaten beobachtet, und in einigen Bodenproben nehmen sie, ihrer Zahl und ihrem Volumen nach, eine hervorragende Stellung ein. Diese Hyphen sind sehr mannigfaltig, man findet breite und schmale, dick- und dünnwandige, verzweigte und unverzweigte usw.

Die von einigen Forschern (372) ihnen zugesprochene Fähigkeit, den atmosphärischen Stickstoff zu binden, wird von anderen (86, 308) geleugnet. In gewissen Böden sind sie, nach Angabe einiger Forscher, die aktivsten Celluloseabbauer und bilden oft mehr Ammoniak als die Bakterien (88, 207, 247, 273, 342, 384, 391).

Auch die *Actinomyceten* sind in den Präparaten durch ihre Fäden oft deutlich zu erkennen.

Sie sollen eine wichtige Rolle bei den mikrobiologischen Vorgängen im Boden spielen durch Zersetzung von Kohlenhydraten, Stickstoffverbindungen und auch Lignin (59). Wenigstens in künstlichen Substraten können sie Cellulose abbauen, Eiweiß als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle ausnutzen, Nitratstickstoff zu Nitrit- (217) und sogar zu Ammoniakstickstoff (271, 272, 385, 389) reduzieren usw.

Die Zahl der *Algencysten* übertraf die der *Protozoencysten*. Die *Mikrosporen* gehören teilweise den Pilzen, teilweise den Bakterien an. Sporen wie Cysten haben selbstverständlich keine größere aktive Bedeutung für die mikrobiologischen Vorgänge im Boden.

Nach den Präparaten zu urteilen haften die Bakterien und auch andere Bodenmikroorganismen unter normalen Feuchtigkeitsverhältnissen im Boden den Bodenpartikeln an und liegen nicht frei von diesen. Im Gegensatz zu der Annahme der Forscher, die die indirekte Methode benutzen, daß man durch Umrühren oder Umschütteln von Boden und Wasser usw. bei geeigneter Verdünnung schließlich einen einzigen Mikroorganismus erhalten kann, zeigte die direkte Methode deutlich, daß die Mikroorganismen so stark an den Bodenpartikeln haften, daß man selbst mit einer kräftigen Propellerumrührung, die zur Herstellung von Bodenaufschlämmungen viel wirksamer ist als Umschütteln usw., nicht alle Mikroorganismen von den Bodenpartikeln oder voneinander trennen kann. Hiermit stehen die Beobachtungen (396, 397) in Übereinstimmung, daß man beim Umschütteln des Bodens mit einem besonderen Vibrationsapparat auch mit der indirekten Methode eine Zahl von Organismen erhalten kann, die sich der mit der direkten Methode erhaltenen nähert. Bekanntlich wird bei der Bestimmung der Individuenzahl mit indirekter Methode hauptsächlich die Plattenmethode benutzt, bei der Voraussetzung ist, daß jede Kolonie von einem einzigen Mikroorganismus abstammt.

Die Beschaffenheit der Bodenteilchen ist ebenfalls von Bedeutung für die Verteilung der Mikroorganismen im Boden (68) und in der Bodenaufschlämmung. Es muß daher die Bestimmung der Zahl der Mikroorganismen mit der indirekten Methode sehr mangelhaft sein, besonders bei Vermehrung der Anzahl Verdünnungen, und so wird der Unterschied zwischen den Ergebnissen der direkten und der indirekten Methoden nicht nur bei der qualitativen, sondern auch bei der quantitativen Bestimmung der Mikroflora des Bodens sehr augenfällig.

So werden z. B. *Bakterien*zahlen je 1 g Boden von 1,5 bis 2,5 Millionen (317), von etwa 9 Millionen (139, 170), aber auch bis 15 (191, 398) oder 20 Millionen (382), bis 40 Millionen (71, 227) und sogar bis 200 Millionen (388) angegeben. Die Zahl der *Algen* ist verhältnismäßig unbedeutend: etwa 50000 (26), die der *Pilze* größer, nämlich etwa 250000 (317) oder bis 500000 (189) und auch bis 1 Million (384), obwohl auch eine so geringe Zahl wie etwa 30000 angegeben wird (386). Die Zahl der *Actinomyceten* ist dagegen bedeutend: von etwa 1 Million (389, 390) oder bis 2,5 Millionen (170) und sogar bis zu 14 Millionen (188, 388). In gefrorenem Boden wurden eine Menge von 34 Millionen (57, 227) und sogar 95 Millionen (58) Bakterien, 9 Millionen Actinomyceten (57, 227) und 85000 (226) Pilze gefunden.

Mit direkten Methoden finden wir bei günstigen Verhältnissen, wie z. B. in Tschernosem, Werte wie 2700 Millionen Mikroben je 1 g (350).

Die Anzahl Mikroorganismen, die vom Verfasser mit seiner Methode erhalten wurde, schwankte in den verschiedenen Serien und auch während der Versuchszeit in einer und derselben Serie. Gleich nach der Behandlung mit Toluol oder Wärme verminderte sich die Anzahl der

Bakterien, Algen und Pilze im Vergleich zur Anzahl in der Kontrollserie, ganz bedeutend, aber schon nach kurzer Zeit begann sie zu steigen, um später die Menge der Mikroorganismen in der Kontrollserie weit zu übertreffen. In der angesäuerten Serie blieb sie dagegen während der ganzen Versuchszeit geringer als in der Kontrollserie. Es ist von Interesse, daß unmittelbar nach der Sterilisierung des Bodens angefertigte Praparate eine auffallend kleine Menge Mikroorganismen, im Vergleich zu dem Boden vor der Sterilisierung, zeigten, wahrscheinlich, weil tote Zellen gar nicht oder nur schlecht vom Cyanosin gefärbt werden. Auch in Präparaten von anderen Serien konnte ein Unterschied in der Färbungsintensität beobachtet werden. Ob dies auf dem Alter der Zellen usw. beruht, kann zur Zeit nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Die Anzahl der Bakterien in der Kontrollserie hielt sich auf etwa 800 bis 900 Millionen. In den partiell sterilisierten Serien konnten aber auch über 3 Milliarden Bakterien vorkommen, während in der auf p_H 5 angesäuerten Serie höchstens 300 Millionen Individuen gezählt wurden. Die Kokken unter 0,5 μ bildeten den bei weitem überwiegenden Teil der Bakterien.

Obwohl eine Durchschnittszahl der Individuen in den verschiedenen Serien nicht leicht zu berechnen ist, besonders infolge des Vorkommens von zooglöa-artigen Kolonien, wurde, um das Verhaltnis zwischen Protozoen und den ubrigen Mikroorganismen in den Bodenproben besser zu verstehen, versucht, die durchschnittliche Zahl zu bestimmen. Von den aktiven *Bakterien* wurde die Zahl der Kokken unter 0,5 μ auf etwa 994 Millionen, von 0,5 bis 1,0 μ auf etwa 175 Millionen, von 1,0 bis 1,5 μ auf etwa 92 Millionen und über 1,5 μ etwa 20 Millionen, die Zahl der Stäbchen auf etwa 27 Millionen, davon der über 1 μ dicken auf etwa 3 Millionen berechnet. Die Menge der Bakterien betrug also im ganzen 1,3 Milliarden Individuen, was bei Tötung dieser Mikroben durch die partielle Sterilisierung dem Boden eine nicht unbedeutende Menge löslichen Stickstoffs zuführen mußte. Da das Gewicht eines Bakteriums durchschnittlich mit $\frac{1}{2{,}1 \cdot 10^{11}}$ g angegeben wird (216), so wiegt die in 1 g Boden befindliche Bakterienmasse in runder Zahl 5 mg. Die Stickstoffmenge bei 25 % Trockensubstanz und 10 % Stickstoffgehalt (277) beträgt etwa 0,125 mg je 1 g oder 125 mg je 1 kg Boden, d. h. ein nicht unbedeutender Teil des löslichen Stickstoffs kann von der Mikrobenmasse geliefert werden.

Die Zahl der *Algen* war bedeutend kleiner und betrug je 1 g Boden 290000 Zellenfragmente, die der Algencysten etwa 1 Million. Die Zahl der *Pilz*fragmente erreichte 540000, die der Sporen 3780000. *Actinomyceten* kamen in einigen Bodenproben in langen Fäden vor,

die aus Massen von Zellen bestanden. Ihre Anzahl konnte in einigen Präparaten mit 1200000 bestimmt werden.

Im Gegensatz zu einigen Forschern (220) ermöglicht besonders die direkte Methode eine Klarstellung des Verhältnisses zwischen den Bodenprotozoen und den übrigen Bodenmikroorganismen. Allerdings kann die direkte Methode keinen Aufschluß darüber geben, welche Mikroorganismen in bezug auf die Fruchtbarkeit des Bodens wichtig, und welche für den Stoffumsatz schädlich oder ohne Bedeutung sind. Die Kenntnis der Morphologie der Mikroorganismen schließt nicht die Kenntnis ihrer Eigenschaften und der Produkte ein, die sie im Stoffumsatz bilden. Auch bei der Bestimmung der Anzahl der kleinsten Mikroorganismen, wie z. B. von *Nitrobacter* mit 0,3 bis 0,4 μ Durchmesser, liegen fur die direkte Methode Schwierigkeiten vor, und es ist fraglich, ob sie durch diese Methode nachgewiesen werden können. Die direkte Methode kann also in einigen Beziehungen sogar hinter der indirekten Methode zuruckstehen. Man darf aber nicht vergessen, daß die Versuche der Zuchtung von bestimmten Mikroorganismen auf kunstlichen Substraten uns gewöhnlich nur zeigen, daß der betreffende Mikroorganismus diese Produkte bei Anwendung des entsprechenden Substrats bilden kann. Im normalen Boden kann ihre Wirksamkeit von ganz anderer Art sein. In dieser Hinsicht sind die kurzlich veroffentlichten Untersuchungen (83) von Interesse, welche zeigen, daß aus Boden isolierte Bakterien, die morphologisch *Azotobacter* glichen, physiologisch diesem gar nicht ahnlich waren. Ferner besitzen die Bakterien die Fähigkeit, morphologisch stark zu variieren, was von Alter, Substrat usw. abhangig ist. Die Ökologie der Bodenmikroorganismen und die Biologie des Bodens sind von so komplizierter Art, daß sie nicht durch die direkte Methode allein gelost werden konnen, sondern die Anwendung verschiedener Methoden erfordern. Mit der direkten Methode haben wir die Möglichkeit, die Änderungen der Zusammensetzung im Kleinleben des Bodens zu verfolgen und oftmals auch eine Vorstellung von den Änderungen der Stoffwechselprodukte im Boden zu erhalten. Durch die indirekte Methode können wir die Funktion isolierter Mikroorganismen in gewissen Substraten untersuchen. Durch Kombination der beiden Methoden werden wir einen besseren Einblick in die diesbezüglichen Probleme bekommen. Wenn es aber gilt, ein allgemeines Bild vom Kleinleben im Boden zu erhalten, ubertrifft die direkte Methode die indirekte weit, da diese uns höchstens eine fragmentarische Aufklärung über die Morphologie und Physiologie einiger isolierter Bodenmikroorganismen geben kann. Insbesondere was die Protozoen-Theorie angeht, vermag man mit der direkten Methode zu beweisen, daß die Anzahl und das Volumen der Bakterien im normalen Boden so groß

ist, daß die Protozoen im Vergleich zu ihnen keine wesentliche Rolle spielen können. Mit indirekten Methoden konnte dies nicht nachgewiesen werden.

Der Lebenszyklus und die Anpassungsfähigkeit der Protozoen an flüssige und halbfeste Substrate und an Boden.

Es war zu erwarten, daß der Lebenszyklus der Protozoen sich im Boden auf Grund der abweichenden Beschaffenheit dieses Mediums etwas anders gestalten würde als in flüssigen und halbfesten Substraten. Die von der Protozoen-Theorie berührten Probleme würden natürlich vollständiger geklärt werden, wenn man Näheres über den Zusammenhang zwischen den Bodenprotozoen und den aquatischen Formen feststellen könnte. Ehe wir aber zu den Versuchen übergehen, soll der Lebenszyklus der aquatischen Protozoen in flüssigen Substraten kurz besprochen werden, da dieser den meisten Bodenprotozoen-Forschern anscheinend wenig bekannt, wenigstens von ihnen oft gar nicht beachtet worden ist.

Die Protozoenentwicklung in Seen und anderen Wasseransammlungen zeigt draußen in der Natur und im Aquarium im Laboratorium eine gewisse Periodizität der Individuenanzahl und der Artzusammensetzung. In der Regel nimmt eine auftretende Protozoenart an Anzahl zu, bis nach kürzerer oder längerer Zeit ein Maximum erreicht ist. Dann fängt die Individuenanzahl an zu sinken, und endlich verschwindet die betreffende Art, um einer anderen Platz zu machen, die wiederum eine analoge Entwicklung durchmacht. Auch die verschiedenen Protozoengruppen folgen oft in einer bestimmten Reihenfolge aufeinander. Zuerst treten z. B. kleine, darauf große *Flagellaten* auf, alsdann kleine, darauf große *Ziliaten* und endlich *Rhizopoden*.

Auch bei Züchtung reiner Linien von Protozoen in künstlichen Substraten findet man solchen periodischen Wechsel von Aufblühen und Depression in der Protozoenentwicklung. Als z. B. ein Individuum von *Colpoda cucullus* in 20 ccm Heuinfus eingeführt wurde, trat am folgenden Tage Vermehrung ein, die sich während der folgenden 3 Tage stark steigerte und am vierten Tage ihr Maximum erreichte. Vom funften Tage an machte sich eine rasche Encystierung bemerkbar, die Zahl der encystierten Protisten nahm weiter zu, und gleichzeitig verminderte sich die Anzahl aktiver *Colpoda*. Am siebenten Tage war die Anzahl aktiver Individuen gegenüber der Anzahl von Cysten unbedeutend, und am achten Tage wurde nur eine kleine Anzahl aktiver Protozoen neben großen Massen von Cysten beobachtet. Während der folgenden 6 Monate wurden die Protozoen in denselben Infusen periodisch untersucht, wobei eine große Anzahl Cysten beobachtet werden konnte, während die Anzahl aktiver Formen unbedeutende Schwankungen aufwies.

Züchtet man reine Linien von Protozoen, die schwer oder gar keine Cysten bilden, wie z. B. *Colpidium*, so findet man dieselbe Periodizität, obwohl das Ausbleiben der Cystenbildung gewisse Abweichungen hervorruft. Wenn ein *Colpidium* in ein kleines Probiergläschen mit 5 ccm Infus eingeführt wird, erreicht die Anzahl aktiver Protozoen nach einer schnellen Vermehrung am fünften oder sechsten Tage ihr Maximum, worauf sie rasch abnimmt. Am zehnten oder elften Tage sind die Protozoen aus dem Substrat so gut wie verschwunden.

Diese mehrfach beobachteten periodischen Erscheinungen in der Protozoenentwicklung hat man als Zyklus, Rhythmus usw. (31 bis 35, 200, 409 bis 411, 413, 419) bezeichnet und mehrere Theorien aufgestellt, um ihre Ursachen zu erklären. Einige Forscher meinen, daß die Ursachen von ausschließlich innerem, biologischem Charakter sind, andere dagegen sehen die Ursachen ausschließlich in den äußeren Bedingungen, hauptsächlich in der Beschaffenheit des Mediums selbst. Wieder andere glauben, daß die Periodizität durch äußere wie auch innere Ursachen hervorgerufen wird (6, 14, 15, 81, 82, 103, 282, 412, 414, 418, 419).

Um die von der Protozoen-Theorie berührten Probleme besser beurteilen zu können, müssen auch Nahrungsaufnahme, Assimilation und das Verhalten gegen Temperatur berücksichtigt werden. Hinsichtlich der Nahrungsaufnahme unterscheiden sich die grünen Protozoen zum Teil sehr wesentlich von den farblosen, da sie sich autotroph entwickeln können, d. h. bei Darbietung nur anorganischer Nährstoffe. So hat der Verfasser, ebenso wie andere Forscher (17, 311, 312), ohne Schwierigkeit *Gonium*, *Chlamydomonas* und *Chlorogonium* während einer längeren Zeit in sterilen *Knop*- oder *Benecke*-Nährlösungen züchten können. Freilich sind nicht alle chlorophylltragenden *Flagellaten* imstande, sich in Lösungen mit ausschließlich anorganischen Nährstoffen zu entwickeln, sondern mehrere verlangen noch organische Stoffe, sind jedoch imstande, ohne Bakteriennahrung auszukommen.

Unter den farblosen Protozoen, dem überwiegenden Teil der Protozoen, haben wir zwischen vorübergehend farblosen und den eigentlich farblosen zu unterscheiden. Zu jenen gehören grüngefärbte *Flagellaten*, die unter bestimmten Lebensbedingungen ihr Chlorophyll verlieren und farblos werden, ihre grüne Farbe jedoch regenerieren, wenn andere, geeignete Bedingungen auftreten. Sie können auch ohne Bakterien leben.

Schon das Vorhandensein von Nahrungsvakuolen bei den Protisten beweist, daß feste Nahrungspartikeln, wie Bakterien usw., für sie eine große Rolle spielen. Früher glaubte man, daß die heterotrophen Protozoen für ihre Entwicklung unbedingt lebende Bakterien erforderten (126, 262), wofür auch mehrere Untersuchungen der letzeren Zeit sprechen (178, 239, 314, 361). Indessen können wenigstens gewisse heterotrophe Protozoen auch auf toten Bakterien (280, 285, 377), animalischem Eiweiß, zermahlenen Muskeln, gewissen Vegetabilien (281) und auf Blutserum (283, 284) gezüchtet werden. Versuche, heterotrophe Protozoen ausschließlich mit löslichen Stoffen anorganischer wie organischer Art zu ernähren, haben sich als sehr schwer durchführbar erwiesen, und es ist bis jetzt nur eine kleine Anzahl solcher

Versuche gelungen (241 bis 244, 296 bis 298), was überdies von anderen Forschern bestritten wird (284, 286, 388). Unter den Protozoen befinden sich übrigens viele kannibalische Formen (13, 129, 185, 252).

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen über die Ernährung kann als bewiesen gelten, daß sowohl Eiweißstoffe (145 bis 147, 260, 278) als auch Kohlenhydrate (48 bis 55, 366) von den Protozoen assimiliert werden. Wie es sich mit dem Fett verhält, darüber wissen wir zur Zeit wenig Sicheres. In bezug auf die Assimilationsfähigkeit fanden sich bei verschiedenen Protistenklassen und sogar bei verschiedenen Arten wesentliche Unterschiede. So kann eine bestimmte Eiweiß- oder Stärkeart von *Ziliaten* assimiliert werden, aber nicht von *Rhizopoden* (104, 258). Bei den mit Nahrungsvakuolen versehenen Protozoen spielt die Reaktion der Nahrungsvakuole für den Abbau der Nahrung eine große Rolle. Einige Forscher bezeichnen die Reaktion als sauer, andere als alkalisch oder neutral (37, 240, 300). In Wirklichkeit dürfte die Reaktion in der Vakuole, wenigstens bei gewissen Protozoen wie bei dem von Verfasser und anderen Forschern (278, 355, 359) beobachteten *Paramaecium*, während des Abbauvorgangs wechseln.

Gewöhnlich findet man in der Protozoenzelle Bakterien, Algen, Zoochlorellen, Protozoen- und Algencysten, Pilzhyphen, Sporen und verschiedene mineralische Partikeln. Von den chemischen Inhaltskörpern der Zelle seien Stärke, Paramylum, Glykogen, Fettropfen und Gase, hauptsächlich CO_2, erwähnt. Außerdem kommen kleine Granulakörner vor, die von einigen (394) als Reservestoffe, von anderen (313) als Enzymträger, die im Dienste der Assimilation stehen, angesehen werden.

Der Abbau der aufgenommenen Nahrung erfolgt durch verschiedene peptische, diastatische u. a. Enzyme (165, 267, 269), mit deren Hilfe die zusammengesetzten Proteine, Stärke, Cellulose usw. angegriffen werden. Dissimilationsprodukte, die die kontraktilen Vakuolen verlassen, bestehen aus Wasser, Harnstoff, Harnsäure, Calciumphosphat usw. (159, 343, 347).

Was die Temperatur, wenigstens in flüssigen Substraten einen der wichtigsten Faktoren für die Protozoenentwicklung (196, 200, 246), anbetrifft, so liegen Minimal-, Optimal- und Maximal-Temperatur in der Regel bei 0 bzw. 20 bis 25° C und bzw. etwa 40° C (370, 421).

Darüber, wie sich bei den Protozoen im Boden der Lebenszyklus, die Assimilation usw. gestalten, liegen zur Zeit keine direkten Untersuchungen vor. Nach Angaben der Bodenprotozoen-Forscher sollen diese Verhältnisse bei den Bodenprotozoen im großen ganzen analog denen der aquatischen Protozoen sein. So z. B. war die Saisonvariation in der Zahl der Bodenmikroorganismen ähnlich der der aquatischen Organismen (71), ebenso die Protozoenteilung in reinen Kulturen bei Laboratoriumversuchen von derselben Periodizität wie bei den Feldversuchen (74), und auch Kannibalismus wurde bei Bodenprotozoen beschrieben (109, 185, 253). Andererseits wurde beobachtet, daß die Veränderungen in biologischer Beziehung bei Verwahrung der Bodenproben im Laboratorium sich anders gestalten als draußen in der Natur (3, 155), und daß die Maximaltemperatur für die bodenbewohnenden Protozoen höher war als für die aquatischen Formen (67, 154).

Mit Hinsicht auf die Protozoen-Theorie ist die Einwirkung der niedrigen Temperaturen von besonderer Wichtigkeit für das Verständnis der Aktivität der Protozoen während der kalten Jahreszeit und bei

ihrer Überwinterung im Boden. Obwohl diese Fragen, wenigstens was die aquatischen Formen anbelangt, von mehreren Forschern behandelt wurden, sind leider noch viele Einzelheiten ungeklärt. Schon 1838 hat *Ehrenberg* (96) mitgeteilt, daß die Protozoen getötet werden, wenn sie mehrere Stunden einer Temperatur von minus 9 bis 12° C ausgesetzt werden. Kurze Zeit aber vertragen sie eine solche Unterkühlung. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß man die Protozoen allmählich an niedrigere Temperaturen gewöhnen kann, so daß sie sich z. B. bei 0° C und sogar bei minus 1° C noch teilen (92), aber bei noch niedrigerer Temperatur gehen sie zugrunde.

Wenn man Protozoen langsam gefrieren läßt, bildet sich zuerst um die betreffende Protozoenzelle eine Eishülle. Allmählich beginnt dann das in der Zelle befindliche Wasser abzuwandern und legt sich als Eisbildung auf die erwahnte Eishülle, was zum Schluß den Tod des Protozoons verursacht. Kuhlt man dagegen das Substrat schnell ab, so gefriert gleichzeitig mit dem Substrat auch die Zellmembran, wobei sich in dieser Eiskristalle bilden. Dies führt zum sofortigen Tode der Protozoenzelle. Die Protozoen können also eine starke Unterkühlung nicht uberleben und sind somit nicht fahig, in gefrorenem Zustande zu uberwintern. Angaben, daß aktive Protozoen eine langere Unterkühlung auf minus 60° C vertragen (306), scheinen irrtumlich zu sein und dürften auf Übersehen der Cysten beruhen.

Es ist anzunehmen, daß sich die Protozoen gegen niedrige Temperaturen in Boden und Wasser gleichartig verhalten. Schon im Herbst treten indessen in unseren Breitengraden kürzere oder längere Perioden mit starker Kälte auf, und während des Winters ist die Temperatur oft weit unter dem Gefrierpunkt, so daß man erwarten muß, daß das Wasser nicht nur außerhalb der Protozoenzelle, sondern auch in der Zellmembran und in der Zelle selbst sich in Eis verwandelt, was den Tod der aktiven Protisten verursachen wurde. Die von einigen Bodenprotozoen-Forschern (226, 227, 340) gemachten Angaben, daß die Protozoen auch während der Winterzeit im Boden im aktiven Zustande vorkämen, sind schwer zu verstehen. Das Vorhandensein aktiver Formen könnte nur dadurch erklärt werden, daß sich weder in der Membran noch im Protoplasma dieser Protozoen im gefrorenen Boden Eis bildet. Bei starker und andauernder Kälte ist das kaum denkbar.

Um mehr Klarheit über die im vorhergehenden behandelten Fragen zu erhalten, was für die Beurteilung der Stichhaltigkeit der Protozoen-Theorie von großer Bedeutung wäre, wurden entsprechende Versuche mit verschiedenen Protozoen, erst in Lösungen, dann auf halbfesten Substraten und schließlich im Boden, vorgenommen.

Von den Protozoen wurden Repräsentanten der aus dem Boden bekannten Klassen gewählt, und zwar folgende Arten von *Rhizopoden*:

Amoeba limax, A. radiosa, Arcella vulgaris, Euglypha alveolaris und *Actinophrys sol*; von *Flagellaten*: *Chlamydomonas monoica, Gonium pectorale, Monas termo, Bodo globosus*; von *Ziliaten*: *Urotricha farcta, Dileptus cygnus, Chilodon uncinatus, Colpidium colpoda, Colpoda cucullus, Paramaecium caudatum, Cyclidium glaucoma, Stentor polymorphus, Halteria grandinella, Pleurotricha grandis, Gastrostyla steinii, Oxytricha fallax, Stylonychia mytilus* und *Vorticella nebulifera*. Diese Protisten wurden durch Impfung von sterilem Heuinfus oder Bodenextrakt mit Boden erhalten. Sie würden also nach der von den Bodenprotozoen-Forschern angenommenen Methodik als echte Bodenprotozoen anzusehen sein. Die betreffenden Protisten wurden entweder als einzelnes Individuum oder als reine Kultur[1], die aus aktiven Individuen und Cysten bestand, in den entsprechenden Substraten gezüchtet. Für einige Versuche, bei denen das an entsprechenden Stellen angegeben worden ist, wurden als Impfmaterial teils Gartenboden, teils Infuse, die eine Mischung von verschiedenen Protozoen und Cysten enthielten, benutzt. In der Regel bestand jeder Versuch aus zwei oder mehreren Parallelversuchen, um die Ergebnisse zuverlassiger zu gestalten.

Zuchtungsversuche in Lösungen.

Infolge der besonderen Eignung der bakterienfreien *Benecke-* und *Knop*-Lösungen für sterile Züchtung von *Chlorogonium, Chlamydomonas* und *Gonium* wurden die Versuche mit den farblosen Protozoen zuerst in diesen Lösungen begonnen, worauf man später zu Mischungen dieser Lösungen mit anderen, die reich an organischen Stoffen waren, wie Heuinfus oder Bodenextrakt überging. Die Protozoen wurden zur Säuberung von Bakterien und anderen Mikroorganismen, die ihnen anhafteten, mehrmals mit sterilem Heuinfus gewaschen, ohne daß allerdings eine Infektion des Substrats durch fremde Mikroorganismen immer ausgeschlossen werden konnte. In mehreren Fällen wurde sie durch bakteriologische Untersuchung festgestellt. Das Waschen, das von *Hargitt* und *Fray* (163) eingeführt wurde, erwies sich als die bequemste der verschiedenen Verfahrungsweisen, die geprüft wurden, um Protozoen bakterienfrei zu bekommen. Durch Kataphorese z. B., die von *Amster* (5) mit Erfolg angewandt wurde, ist es mir nicht gelungen, sterile Protozoen zu erhalten. Noch weniger befriedigten Versuche, die negative Geotaxis auszunutzen. Auch Zentrifugieren und Verwendung der Phototaxis und des Steigrohres blieben erfolglos. Eine Behandlung der Cysten mit Desinfektionsmitteln oder Wärme führte zu befriedigenden Ergebnissen, war aber sehr umständlich und bei Formen, die keine Cysten bildeten, unanwendbar.

Arcella. Bei Impfung steriler Mischungen von *Benecke-* und *Knop*-Lösungen, Heuinfus oder Bodenextrakt mit *Arcella* wurde stets eine

[1] Die Ausdrücke: „Reine Kultur“ oder „reine Linie“ werden in der vorliegenden Arbeit dem Begriff Individuallinie oder Klon entsprechend angewandt.

Infektion beobachtet, weil diese Art, wie *Thecamoeben* überhaupt, offenbar nur sehr schwierig von Bakterien befreit werden kann, da die fremden Mikroorganismen sich in dem Raum zwischen Schale und Plasma „verstecken". Die Entwicklung der Tiere dürfte bei Nacht einsetzen; denn während des Tages wurde keine Vermehrung beobachtet. Weiter fiel die oft vorkommende Plasmogamie von zwei oder drei und bisweilen noch mehr Individuen auf, ebenso die Bildung von Gasblasen bei vielen Individuen.

Gastrostyla. Nach Impfung von *Gastrostyla* in *Benecke*-Lösung konnte bei täglicher Untersuchung während 10 Tagen keine Vermehrung festgestellt werden, obwohl sie nach wie vor lebten. In einer Mischung gleicher Teile *Benecke*-Lösung und Heuinfus oder Bodenextrakt gestaltete sich die Entwicklung anders. Nach 24 Stunden wurde Teilung beobachtet, die Vermehrung ging wahrend der folgenden 3 Tage langsam weiter. Dann fing die Anzahl aktiver Individuen an abzunehmen, und es begannen Cysten aufzutreten. Nach weiteren 2 Wochen waren die aktiven Formen verschwunden. Wurde dagegen die Lösung jetzt mit reiner *Bacillus subtilis*-Kultur versetzt, so schlüpften die Cysten aus, und nach 5 Tagen erreichte die Zahl der aktiven Individuen ihr Maximum. Wahrend der darauffolgenden Zeit wurden die aktiven Formen durch Cysten ersetzt, so daß am elften Tage alle encystiert waren. Ansauern des Substrats mit Essigsaure oder Alkalisieren mit Soda verursachte keine Veränderung in der Protozoenentwicklung, was bewies, daß die Reaktion hierbei ohne Bedeutung war.

Bei Zuchtung in sterilem Heuinfus oder Bodenextrakt konnte in einigen Fallen nach 4 bis 5 Tagen eine Teilung beobachtet werden und nach weiteren 3 bis 4 Tagen auch eine Vermehrung der Individuen. Eine bakteriologische Untersuchung zeigte jedoch, daß das Substrat infiziert war. Bei fortgesetzter Beobachtung konnte man nach 2 bis 3 Tagen das Auftreten von Cysten feststellen, und nach einer kurzen Zeit waren im Substrat viele Cysten und wenige aktiven Formen vorhanden. Ein Zusatz von *Bacillus subtilis*-Kultur zum Heuinfus führte schon am folgenden Tage zum Ausschlupfen aus den Cysten und starker Vermehrung der aktiven Protisten.

Paramaecium. Bei Impfung von *Paramaecium* in sterile *Benecke*-Lösung konnte in einem Zeitraum von 14 Tagen bei täglichen Untersuchungen keine Entwicklung beobachtet werden, dagegen wurde bei Einführung in eine Mischung von gleichen Teilen *Benecke*-Lösung und Heuinfus Teilung am fünften Tage beobachtet. Die Vermehrung der Individuenzahl dauerte langsam während der folgenden 20 Tage an, worauf die Anzahl lebender Individuen abzunehmen begann, und nach 2 Wochen konnten nur einzelne *Paramaecium*-Individuen beobachtet werden. Indessen dürfte die Entwicklung in diesem Falle einer Bakterien-

infektion zuzuschreiben sein, die durch bakteriologische Untersuchung festzustellen war. Die langsame Entwicklung dürfte ungenügender Nahrung (schwache Bakterienentwicklung) zuzuschreiben sein. Eine kleine Anzahl Individuen lebte im Substrat längere Zeit (einige Monate), zeigte aber große Vakuolen und war im übrigen stark deformiert.

Colpoda. Versuche mit *Colpoda* hatten ähnliche Ergebnisse wie mit *Gastrostyla.* Zuerst entwickelten sich die aktiven Formen sehr stark, dann begannen die Cysten aufzutreten und die Anzahl aktiver Formen sich entsprechend zu verringern. In den infizierten Substraten fand die Entwicklung früher statt, und die Anzahl Individuen war größer.

Cyclidium. Auch diese Ziliaten konnten sich nicht in reiner *Benecke*-Lösung entwickeln. In einer Mischung von *Benecke*-Lösung und Heuinfus war die Entwicklung gut; es wurden sowohl aktive Individuen wie Cysten beobachtet, in der Regel aber erwiesen sich die Kulturen durch Bakterien infiziert. Die Infektion ist leicht erklärlich, wenn man die geringe Dimension dieser Art und die damit zusammenhängende Schwierigkeit berücksichtigt, sie durch Waschen bakterienfrei zu erhalten.

Dileptus. Als reine Linie im bakterienreichen Heuinfus gezüchtet, entwickelte sich *Dileptus* langsam und zeigte am dritten Tage acht Individuen. In denselben Infus wurde zu dieser Zeit einige von einer reinen Linie herstammende *Colpoda*-Individuen eingeführt. Diese fingen an, sich stark zu entwickeln, und schon nach 2 Tagen war eine Masse aktiver *Colpoda* und *Colpoda*-Cysten vorhanden, während die *Dileptus*-Individuen sich nur unbedeutend vermehrt hatten, was dadurch zu erklären sein dürfte, daß verschiedene Protozoenarten ungleiche Bakteriennahrung und ungleiche physiologische Bedingungen erfordern. Von Interesse war, daß mehrere *Dileptus*-Individuen mit *Colpoda*-Cysten vollgepfropft waren, obwohl das Substrat keinen Mangel an Bakterien zeigte. Während der folgenden Zeit begann *Dileptus*, trotz Vorhandensein von Nahrung in Form von Bakterien und *Colpoda*-Cysten, sich zu encystieren, und schließlich waren alle aktiven Individuen verschwunden.

Pleurotricha. Bei Entwicklung einer reinen Linie von *Pleurotricha* in einer Mischung von *Benecke*-Lösung und Heuinfus konnte in den 6 ersten Tagen keine Vermehrung der Protozoenanzahl beobachtet werden, obwohl das Individuum weiterlebte. Es muß dem Substrat an genügender Nahrung gefehlt haben. Während der folgenden 4 Tage fand indessen eine kräftige Protozoenentwicklung statt, was wahrscheinlich mit der Entwicklung von Bakterien zusammenhing, die im Substrat nachgewiesen wurden. Vom zehnten Tage an begannen die aktiven Individuen stark abzunehmen und an deren Stelle Cysten aufzutreten. Nach weiteren 2 Tagen war eine kleine Anzahl aktiver Individuen und

eine Menge Cysten festzustellen. Eine Bestätigung, daß die Encystierung durch Mangel an lebenden Bakterien verursacht wurde, ist darin zu erblicken, daß nach Zusatz von einigen ccm Infus, das eine reine Kultur von *Bacillus subtilis* enthielt, schon am folgenden Tage eine große Anzahl Cysten sich in aktive Protozoen verwandelt hatten. Die von den Protozoen verlassenen Cysten lagen in Menge durchbohrt oder zersprengt am Boden der Gefäße. Ferner wurden mehrere Protozoen im Stadium des Ausschlüpfens aus den Cysten beobachtet, wobei man die Protozoen sich innerhalb der Cyste schnell in verschiedenen Richtungen bewegen sah. Solche Cysten zeigten gewöhnlich eine dünnere Wand und waren etwas größer als die Ruhecysten, d. h. solche, in welchen das Ausschlüpfen noch nicht begonnen hatte. Außerdem wurden mehrere frei schwimmende Tiere in Teilung beobachtet und neugebildete Tochterzellen, die bedeutend kleiner waren als die erwachsenen Individuen. Die schnelle Entwicklung war jedoch nach weiteren 2 Tagen zum Stehen gekommen, worauf eine starke Cystenbildung mit entsprechender Verminderung der Anzahl aktiver Individuen begann. Die aktiven Formen wiesen innerhalb des Zellkörpers Cysten ihrer eigenen Art auf.

Stylonychia. In einer *Stylonychia*-Kultur, deren Entwicklung in einer Mischung von *Benecke*-Lösung und Bodenextrakt in ungefähr derselben Weise wie bei der vorigen Art verlief, wurde ein noch stärkerer Fall von Kannibalismus beobachtet. Es wurden aktive Formen angetroffen, welche normale *Stylonychia*-Individuen verschlangen. Die verschluckten Tiere wurden zur Hälfte in den Cytopharynx hineingezogen, wodurch eine starke Vergrößerung des Volumens des Kannibaltieres verursacht wurde.

Die Ergebnisse dieser Versuche sprechen dafür, daß die heterotrophen Protisten lebende Bakterien oder wenigstens feste Nahrungspartikeln für ihre Entwicklung brauchen. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß bei einer anderen Beschaffenheit der Nährlösungen oder bei Versuchen mit anderen Protozoenarten die Ergebnisse anders ausfallen könnten. In Böden, in denen anorganische und organische Stoffe reichlich vorkommen, sind auch Bedingungen denkbar, die zur Deckung des Nahrungsbedarfs der Protozoen ohne Bakterien ausreichen.

Züchtungsversuche auf halbfesten Substraten.

Bei diesen Versuchen wurden als Substrat Agar und Gelatine in verschiedenen Konzentrationen benutzt. Der Agar wurde erst 24 Stunden in fließendem Wasser gewaschen. Das vom Agar absorbierte Wasser wurde dann bei der Berechnung der Konzentration mitgerechnet. Das Substrat wurde in Konzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 % hergestellt und enthielt 0,05 % *Knops* Salze. Das Gelatinesubstrat wurde in Konzentrationen von 2, 5 und 10 % angewendet und bestand teils aus Bouillongelatine,

teils aus Gelatine mit Zusatz von 0,005% *Knops* Salzen. Das sterilisierte Agar- bzw. Gelatinesubstrat wurde warm in sterile *Petri*-Schalen eingeführt, wo man es vor Einführung des Impfmaterials erstarren ließ. Um Bakteriennahrung zu erhalten, wurden die Substrate mit reinen Kulturen von *Bacillus subtilis* versetzt.

Nach einigen Untersuchungen (84, 425) übt die Festigkeit des Substrats einen Einfluß auf die Protozoenentwicklung aus. So kann *Euglena gracilis* sich auf 4% Agar ohne Zusatz von Nahrung nicht entwickeln. Auf 5% Gelatine mit Peptonzusatz teilen sich die Euglenen im Dunkeln im Ruhestadium, am Licht kriechen die Tiere, wobei sie eine unregelmäßige Form annehmen. Auf 20% Gelatine schließlich findet man keine frei kriechenden Euglenen mehr, sondern nur sich in der Ruhe teilende. Der Einfluß des Substrats wurde auch durch die Versuche des Verfassers, wie aus dem Nachstehenden hervorgeht, bestatigt.

Bei Impfung von 0,5% Agar[1] mit bakterienreichem Heuinfus, das eine gemischte Rohkultur von *Amoeben, Flagellaten* und *Ziliaten* enthielt, entwickelten sich sowohl *Amoeben* als auch kleine *Flagellaten* und kleine *Ziliaten*. Bei Impfung desselben Substrats mit Gartenboden entwickelten sich grüne *Flagellaten* in großer Menge, die Entwicklung anderer Protozoen war dagegen spärlich.

Bei Impfung von 1% Agar mit bakterienreichem Heuinfus, das eine gemischte Rohkultur von *Amoeben, Flagellaten* und *Ziliaten* enthielt, entwickelten sich Protozoen aus den verschiedenen Klassen, aber in geringerer Anzahl als bei der Impfung von 0,5% Agar und mit im Vergleich zum Verhalten in 0,5% Agar gehemmter Bewegungsfähigkeit. Bei Impfung desselben Substrats mit Gartenboden hatten sich am zweiten Tage einige *Amoeben, Flagellaten* und *Ziliaten* entwickelt. Unter den *Ziliaten* fiel besonders die Entwicklung von *Colpoda cucullus* und *Colpoda steinii* auf. Sie nahmen während der folgenden 7 Tage schnell an Anzahl zu und fingen dann an, sich zu encystieren. Gleichzeitig steigerte sich die Encystierung bei den übrigen Protozoen, und 1 Monat nach der Impfung konnten nur Protozoencysten beobachtet werden. Während weiterer 2 Monate wurden keine aktiven Protozoen gefunden. Als aber jetzt Heuinfus, das eine reine *Bacillus subtilis*-Kultur enthielt, in solcher Menge zugesetzt wurde, daß es eine etwa 0,5 cm hohe Flüssigkeitsschicht über der Agarfläche bildete, begann schon nach einigen Stunden das Ausschlüpfen der Protozoen aus den Cysten, und nach 24 Stunden wurde eine große Zahl aktiver *Colpoda*-Individuen beobachtet. Nach einigen weiteren Tagen entwickelten sich auch andere Protozoen, unter denen *Oxytricha* und *Halteria* stark hervortraten.

Versuche mit demselben Impfmaterial auf 1,5 und 2% Agar zeigten, daß die Anzahl entwickelter Protozoen und die Bewegungsfähigkeit bei Steigerung der Festigkeit des Substrats abnahm.

[1] Unter Agar ist in diesem Abschnitt *Knop*-Agar gemeint.

Im Laufe der Zeit verdunstet das Wasser, das Substrat wird immer fester und entspricht immer mehr einem solchen von höherer Konzentration. Beobachtungen, die beim Studium der Entwicklung der Mikrofauna auf Agarsubstrat während einer längeren Zeit vorgenommen wurden, ergaben, daß die Mikrofauna ihrer Zusammensetzung nach mit der Zeit immer mehr einer solchen auf einem festeren Substrat gleicht.

Das Ergebnis aller dieser Versuche mit gemischten Kulturen erlaubte folgende Schlüsse: Die *Ziliaten* brauchen eine größere Flüssigkeitsmenge, um sich zu bewegen und ihre Lebensfunktionen aufrechtzuerhalten, als *Flagellaten* und *Rhizopoden*. Sie verschwinden deshalb in erster Linie, zunächst gewöhnlich die größeren Formen, dann die kleineren. Die *Amoeben* können sich, wie die Versuche zeigten, leichter als andere Protozoen an halbfeste Substrate anpassen. Sie gedeihen z. B. auf 2 %igem Agar, wo andere Protozoen sich nicht mehr entwickeln. Im allgemeinen bewahren sie am längsten von allen Protozoen ihre Bewegungsfähigkeit, und wenn sie auch aufhoren, ihre Pseudopodien hinauszuschieben, so arbeiten doch ihre kontraktilen Vakuolen noch längere Zeit, allerdings langsamer als gewöhnlich. Nur die *Thecamoeben*, die durch ihre Schalen besser als die übrigen Protozoen gegen Austrocknen usw. geschützt sind, können mit den *Amoeben* konkurrieren. Dadurch dürfte zu erklären sein, daß mehrere Forscher (164, 380) gewisse *Thecamoeben*, wie *Euglypha*, *Trinema*, *Assulina* und *Corythion*, in aktivem Zustande auch an dürren Orten gefunden haben. Einige widerstandsfähige *Thecamoeben* hatten jedoch eine Verkleinerung erfahren.

Paramaecium. Bei Impfung von 0,5 %igem Agar mit einem Individuum einer reinen Linie von *Paramaecium caudatum*, das aus Heuinfus entnommen war, konnte erst am dritten Tage eine Teilung beobachtet werden. Während weiterer 7 Tagen hat die Anzahl Protozoen langsam zugenommen. Während eines Monats wurde dann die *Paramaecium*-Entwicklung verfolgt. Die Tiere waren in guter Verfassung, aber ihre Anzahl blieb nahezu unverändert, und ihre Bewegungsfähigkeit nahm merkbar ab. Die Erklärung der langsamen Steigerung der Anzahl Individuen dürfte darin zu suchen sein, daß *Paramaecium* für seinen Zuwachs Bakteriennahrung verlangt. Die Nahrung, die in Form von *Knop*-Salzen im Agar vorhanden war, genügte nicht zu einer normalen Entwicklung der Tiere. Die beobachtete langsame *Paramaecium*-Entwicklung dürfte auf der Entwicklung von Bakterien beruhen, die das geimpfte *Paramaecium*-Individuum begleiteten. Denn nach Zusatz von einigen ccm Infus, das eine *Bacillus subtilis*-Kultur enthielt, fand eine starke Entwicklung von *Paramaecium* statt. Daß sich dabei nicht die verminderte Festigkeit des Substrats geltend

machte, geht daraus hervor, daß der Zusatz der erwähnten Infusmenge die Konzentration nicht in nennenswertem Grade veränderte. Außerdem entwickelte sich *Paramaecium* auch in Infusen ohne Bakterien schlecht.

Bei Impfung von 1 %igem Agar mit einem Individuum einer reinen *Paramaecium*-Linie, das dem 0,5 %igen Agar entnommen wurde, war das Tier nach 24 und auch nach 48 Stunden noch am Leben, konnte sich aber nicht fortbewegen und ging am dritten Tage zugrunde, ohne sich geteilt zu haben. Bei einer anderen Impfung, die in ähnlicher Weise ausgeführt wurde, teilte sich dagegen das *Paramaecium*, und nach 48 Stunden wurden vier Individuen beobachtet. Weiter ging die Teilung indessen nicht, und während weiterer 14 Tage verblieb die Anzahl dieselbe. Von dieser Zeit an nahm indessen die Ortsbeweglichkeit der Tiere, die schon früher sehr langsam war, merklich ab. Nach weiteren 3 Tagen war die Zahl der Individuen auf drei reduziert, und nach weiteren 4 Tagen waren alle tot. Solche Beobachtungen, die wiederholt gemacht werden konnten, lassen darauf schließen, daß der Zustand der Protozoen bei der Impfung, vielleicht im Zusammenhang mit ihrem Alter, für ihre Weiterentwicklung von Bedeutung ist.

Bei Impfung von 1,5 und 2 %igem Agar mit reiner *Paramaecium*-Linie konnte keine Entwicklung beobachtet werden, und die Tiere gingen nach kurzer Zeit zugrunde.

Colpoda. *Colpoda steinii* konnte dagegen nicht nur auf 0,5- und 1 %igem Agar, sondern auch auf 1,5- und 2 %igem Substrat gezüchtet werden. Sie encystierte sich indessen um so früher, je fester und bakterienärmer das Substrat war. Eine erwiesenermaßen bakterienfreie Züchtung konnte jedoch nicht erhalten werden, da die Entwicklung der Tiere in einem dem Anschein nach bakterienfreien Substrat sehr langsam vor sich ging. Es ist bemerkenswert, daß diese Art, die gewöhnlich formbeständig ist, ihre Form auf dem Agar je nach dem Wassergehalt des Substrats stark veränderte. Auf 0,5 %igem Agar oder im Kondenswasser der übrigen Agar-Substrate hatten die Tiere ein normales Aussehen und schwammen, wie gewöhnlich, mit Hilfe ihrer Zilien. Aber auf 1-, 1,5- und 2 %igem Agar krochen die Tiere ähnlich *Amoeben*, so daß man sie oft nicht mehr als *Ziliaten* erkennen konnte.

Halteria. Halteria konnte auf 0,5- und 1 %igem Agar mehrere Monate beobachtet werden, wobei sie sich sehr gut entwickelte. Die bekanntlich sehr schnelle Bewegung des Tieres wurde in 0,5 %igem Substrat ersichtlich nicht gehemmt. Auf 1,5- und 2 %igem Agar waren dagegen die Züchtungsversuche erfolglos. Die Befreiung der Tiere von Bakterien war natürlich mit Rücksicht auf die Kleinheit der Form nicht immer sicher, und daher kann über wirklich bakterienfreie Züchtung nichts berichtet, werden.

Oxytricha. Diese Art konnte sich sehr leicht an das Leben auf 0,5 %igem Agar anpassen. Die Entwicklung ging ziemlich rasch vonstatten da, wo viele Bakterien vorhanden waren, war dagegen sehr verlangsamt, wenn wenig oder gar keine Bakteriennahrung zu finden war. Die Bewegung war in 0,5 %igem Agar merklich gehemmt im Vergleich zur Bewegung in Heuinfus, aber die Teilung der Tiere und ihre Entwicklung überhaupt wurde bei Vorhandensein von Bakteriennahrung, wie erwähnt, durch die Festigkeit des Substrats sehr wenig gehindert. Die Entwicklung auf 1 %igem Agar fiel unregelmäßig aus, auf 1,5- und 2 %igem mißlang sie.

Monas und *Bodo.* Von diesen *Flagellaten* konnte *Monas* sich auf 0,5- und 1 %igem Agar gut entwickeln, während die Entwicklung von *Bodo* auf 1 %igem schlechter vor sich ging.

Das Ergebnis dieser Versuche dürfte den Schluß erlauben, daß die heterotrophen Protozoen auch auf halbfesten Substraten von ausschließlich löslichen Stoffen nicht leben können, sondern Nahrung in Form von festen Partikeln, wie Bakterien, benötigen. Je fester das Substrat ist, desto mehr wird die Protozoenentwicklung gehemmt, und je kleiner eine Protozoenart ist, desto leichter kann sie sich an das Leben im halbfesten Substrat anpassen.

Im Anschluß an die heterotrophen Protozoen seien hier auch die grüngefärbten Formen mit einigen Worten berührt. *Chlamydomonas* und *Gonium* konnten leicht nicht nur auf 0,5- und 1 %igem Agar, sondern auch auf 1,5- und 2 %igem Agar gezüchtet werden und bildeten schon nach einigen Tagen einen grünen Überzug auf dem Substrat, obwohl sie sich nur langsam ausbreiteten.

Was die Züchtung auf Gelatine anbelangt, so hat sich gezeigt, daß dieses Substrat nach verhältnismäßig kurzer Zeit von peptonisierenden Bakterien infiziert wird, welche die Gelatine zerstören, die dadurch ihre Eigenschaft eines festen Substrats einbüßt. Die Entwicklung der Protozoen auf Gelatine gestaltete sich indessen, solange diese ihre Festigkeit bewahrte, ähnlich wie auf Agar, d. h. je größer die Festigkeit des Substrats war, eine desto geringere Anzahl Protozoen war imstande, sich in ihm zu entwickeln, und desto langsamer war ihre Bewegung und umso schwächer ihre Entwicklungsfähigkeit. Ferner wichen die Protozoen in ihren Dimensionen und in ihrem Habitus um so stärker von der Norm ab, je höher die Gelatinekonzentration war. Die Züchtung auf Gelatine bestätigte also in Übereinstimmung mit den Agarversuchen, daß die Entwicklung von Protozoen sich auf halbfesten Substraten anders gestaltet als in einem flüssigen Medium.

Züchtungsversuche im Boden.

Der alte Begriff vom Boden als einer Masse, die aus mineralischen und organischen Bodenpartikeln besteht, die von einer feinen Schicht Feuchtigkeit umgeben sind, hat sich während der letzten Jahre auf Grund genauer physikalischer und chemischer Untersuchungen bedeutend gewandelt. Wir wissen zur Zeit, daß die Beschaffenheit des Bodens von sehr komplizierter Art ist. Der Boden enthält zwar mineralische und organische Partikeln, aber diese bilden sozusagen einen Kern, der von verschiedenen Kolloiden umgeben ist, die von komplizierter chemischer und physikalischer Struktur sind. Der Raum zwischen solchen Partikeln ist mit Wasser, Salzen und Gasen gefüllt. Infolgedessen bildet der Boden ein vorzügliches Medium für Mikroorganismen, die darin die nötige Nahrung und andere Lebensbedingungen für ihre Entwicklung finden.

Bei der Ausführung dieser Versuche wurden sterile Proben aus Gartenboden von je 50 g mit verschiedenen Mengen Heuinfus versetzt, so daß Serien Bodenproben mit verschiedenem Feuchtigkeitsgehalt, etwa 25, 20, 15 und 10 %, erhalten wurden. Das in die Bodenproben eingeführte Infus enthielt eine reine Kultur von *Bacillus subtilis*, damit auch lebende Bakterien als Nahrung vorhanden wären. In die verschiedenen Bodenserien wurden reine Linien von Protozoen und Cysten eingeführt, deren Entwicklung mit Hilfe der direkten Methode näher untersucht wurde. Impfung sowohl mit aktiven Formen als auch mit Cysten wurde vorgenommen, weil es denkbar war, daß aktive Formen bei der Impfung infolge der großen Oberflächenspannung, welcher die Zelle beim Überführen von Infus in Boden ausgesetzt war, zugrunde gehen. Die Cysten dürften hierbei nicht beschädigt worden sein, und wenn der Boden für sie wirklich ein geeignetes Medium war, waren sie imstande, sich unbehindert zu entwickeln. Bei Impfung von *Paramaecium* und *Colpidium* wurden nur aktive Formen eingeführt, da Cysten dieser Formen nicht erhalten werden konnten.

Es wäre freilich wünschenswert, statt sterilisierten Bodens nichtsterilisierten zu benutzen, um die natürlichen Verhältnisse zu haben, aber für das Studium der Veranderungen einer gewissen Protozoenart im Boden muß die Sicherheit gegeben sein, daß wir zu jeder beliebigen Zeit wirklich die betreffende Art vor uns haben. Dies kann aber nur dann geschehen, wenn keine andere lebende Protozoen oder Cysten vorhanden sind, die Verwechslungen verursachen können. Jedenfalls dürften wir eine bessere Vorstellung von der Anpassung an das Bodenleben bei Benutzung von sterilisiertem Boden erhalten als bei Benutzung von Infusen oder halbfesten Substraten.

Von den untersuchten Protozoen konnte sich *Dileptus* in den hergestellten Serien gar nicht entwickeln. *Paramaecium* und *Oxytricha* und andere große Formen konnten nur in gesättigten Bodenserien in ziemlich schlechter Entwicklung beobachtet werden. Die *Arcella*-Züchtung fiel sehr unregelmäßig aus; verschiedene Individuen konnten in Bodenserien mit und ohne freie Flüssigkeitsschicht beobachtet werden. Die in Bodenserien entwickelte Form zeigte, daß eine Ver-

minderung des Volumens dieser Art bei der Anpassung an das Leben im Boden stattfindet (siehe *l* der Abb. 13). Das Anpassungsvermögen der übrigen Protozoen, wie *Amoeba, Monas, Bodo, Colpoda, Colpidium, Urotricha* und *Cyclidium,* konnte in verschiedenen Bodenproben verfolgt werden, obwohl diese Formen sich nicht in allen Serien entwickelten. Wir werden hier *Colpoda* betrachten, deren Veränderungen bei der Anpassung an Leben und Entwicklung im Boden in Einzelheiten untersucht werden konnten.

In der Infusschicht der gesättigten Bodenserien hatten die *Colpoda*-Individuen den gewöhnlichen Habitus und zeigten eine normale Entwicklung, wie man sie bei den aquatischen Formen findet, d. h. es waren normale aktive, in Teilung begriffene und encystierte Individuen vorhanden. Die aktiven Formen bewegten sich lebhaft, zeigten innerhalb der Zelle normale Nahrungsvakuolen, pulsierende Vakuolen, Granula usw. (siehe *m* der Abb. 13). In Serien ohne freie Flüssigkeitsschicht fanden wir abweichende Tiere und zwar um so mehr vom normalen Habitus abweichende, je geringer die Feuchtigkeit in der Bodenserie war. Bei einigen Individuen konnte man noch die Morphologie der geimpften Form und ihre Kernstruktur wiedererkennen, obwohl ohne Kenntnis des Ausgangsmaterials die Artbestimmung gewisse Schwierigkeiten verursacht hätte. Andere Individuen hatten das Volumen, die Form, den Kern und die Nahrungsvakuolen so verändert (siehe *n, o* und *p* der Abb. 13), daß sie mehr einer *Amoeba* als einer *Ziliate* glichen, und daß ihre Identifizierung ohne Kenntnis des Ursprungs unmöglich war. Endlich befanden sich die *Colpoda*-Individuen, besonders in den Bodenserien mit niedrigem Wassergehalt, im Encystierungszustand (siehe *q* und *r* der Abb. 13). Wenn eine Serie von Bodenproben mit geringem Feuchtigkeitsgehalt durch Zusatz von Infus in solche von höherem Feuchtigkeitsgehalt oder in wassergesättigte umgewandelt wurde, konnte man eine *Colpoda*-Entwicklung in umgekehrter Richtung, d. h. von Cysten zu *Amoeba*-ähnlicher Form und endlich zu normaler Wasserform erhalten. Es findet also eine morphologische Veränderung statt, wenigstens bei gewissen Protozoen, die sich an das Leben im Boden anpassen.

Was die anderen erwähnten Protisten anbelangt, so haben auch sie bei der Anpassung an das Leben in den verschiedenen Bodenserien Veränderungen erlitten. Diese traten jedoch nicht so stark hervor wie bei *Colpoda,* was teils ihrer kleineren Dimension, teils ihrem weniger ausgeprägten Veränderungsvermögen zuzuschreiben sein dürfte. Gemeinsam bei der Anpassung an das „Bodenleben" war die Größenverminderung, die sich um so stärker erwies, je größer das Protozoon war. So änderten *Monas, Bodo* und *Cyclidium* ihr Volumen weniger als *Urotricha,* diese aber weniger als *Colpidium.* Die Ergebnisse dieser

Versuche bestätigen also die früher gemachten Erfahrungen von der Abhängigkeit der Protozoenentwicklung von der Beschaffenheit des Substrats.

Durch diese Untersuchungen konnte somit der Zusammenhang zwischen dem Bodenkleinleben und den Lebensbedingungen im Boden studiert werden. Eine *Ziliate*, wie *Colpoda*, hat die Möglichkeit in Infus oder wassergesättigtem Boden sehr schnell und ohne Formveränderung die bakterienreichen Stellen aufzusuchen und umgekehrt giftige Stellen zu vermeiden. Ihre Vermehrung und Entwicklung geht also unter günstigen Verhältnissen vor sich. Wenn sie aber aus einem oder dem anderen Grunde in nicht wassergesättigten Boden hineinkommt, muß ihre Entwicklung sich ganz anders gestalten, muß sie auch bei verhältnismäßig hohem Feuchtigkeitsgrad und guten Nährstoffverhältnissen ihre Form verändern und ihr Volumen vermindern, um sich dem Raum zwischen den Bodenpartikeln anzupassen. Ferner kann sie sich im Boden nicht schnell bewegen. Es liegt auf der Hand, daß die Bodenprotozoen sich als Bakterienverschlinger nicht in demselben Umfang wie aquatische Protozoen von normaler Größe und in ihrem normalen Wassermedium betätigen können. Dies gilt natürlich ganz besonders von den kleinen Bodenformen, die von *Azotobacter*-Größe sind.

Bei direkter Untersuchung bekommt man ein mehr oder weniger konstantes Bild vom Kleinleben des Bodens und dem Stoffumsatz, bei indirekter erhält man verschiedene Ergebnisse, da es oft Cysten sind, die die Artzusammensetzung der Mikrofauna bestimmen, und da die größeren aquatischen Formen in ganz anderer Weise auf die Bakterienflora und den Stoffwechsel einwirken wie die eigentlichen Bodenprotisten.

Wir wollen noch kurz die Bedeutung der Cysten besprechen. Die Cystenfrage ist leider, wie erwähnt, von den meisten Bodenprotozoen-Forschern unbeachtet gelassen worden, und darin dürfen sicherlich die Ursachen vieler Widersprüche in den Ergebnissen liegen. Die Cysten sind äußerst kleine kapselartige Bildungen, in die sich die Protozoen gewöhnlich verwandeln, um sich vor ungünstigen Lebensbedingungen, wie Trockenheit, Kälte, Nahrungsmangel usw. zu schützen (8, 44, 46, 104, 199, 318). Die Cysten sind gegen Temperaturextreme weit resistenter als die aktiven Formen (67, 261, 377, 424). Jahrelang können sie Dürre vertragen. Cysten in Bodenproben, die über 49 Jahre in geschlossenen Behältern verwahrt wurden, hatten ihre Entwicklungsfähigkeit nicht eingebüßt (135, 137). Sie passieren gewöhnlich die Därme von Tieren und Menschen, ohne geschädigt zu werden. Wie Staubpartikeln werden sie ohne Schwierigkeit durch die schwächsten Luftströme auf große Strecken weggeführt. Sie haften leicht an Pflanzen, Insekten, Tieren und Menschen und werden so verbreitet. Die Rolle der Cysten für die Protozoenverbreitung ist von vielen Forschern klargelegt worden (44 bis 46, 222, 225, 315, 362, 363). Dabei kann die Entwicklung der Cysten zu aktiven Protozoen schon nach einigen Stunden, ja selbst Minuten, vor sich gehen (197, 199). Die Zeit, die zur

Entwicklung der aktiven Protozoen aus Cysten erforderlich ist, hängt von den physiologischen Bedingungen des Mediums, dem Alter der Cysten, der Temperatur usw. ab. Die Widerstandsfähigkeit der Cysten und die Leichtigkeit, mit der sie sich verbreiten, erklärt, warum man die gleichen Formen aus Bodenproben von weit entfernten Weltteilen erhalten kann. Darin ist sicherlich zum großen Teil die „Unabhängigkeit“ der „Bodenprotozoen“ von Jahreszeit, Reaktion, Feuchtigkeit usw., sowie auch die Übereinstimmung der Mikrofauna des Bodens und des Wassers begründet.

Zusammenfassung.

In verschiedenen Bodenproben von normalem Wassergehalt wurde mit einer hierzu ausgearbeiteten direkten Methode das Vorkommen verschiedener Protozoen festgestellt; die Existenz einer Bodenmikrofauna läßt sich also nicht leugnen. Ihre Vertreter sind dem Leben im Boden besonders angepaßt. Auffallend ist bei ihnen ihre geringe Dimension, die auch bei den Formen zu beobachten ist, die ihrer Morphologie nach den aquatischen Protozoen gleichen. Größere aquatische Formen werden, wenn sie sich dem aktiven Leben im normalen Boden anpassen, so stark verändert, daß sie kaum erkennbar sind. Im Zusammenhang damit muß auch ihre biologische Bedeutung ganz verändert sein im Vergleich zu den Verhältnissen im Wasser. Die eigentlichen Bodenformen gehören meist zu den *Flagellaten* und dann zu den *Rhizopoden*. *Ziliaten* dagegen wurden nur ausnahmsweise beobachtet.

Die eigentlichen Bodenprotisten bilden im Vergleich zu den übrigen Bodenmikroorganismen sowohl in qualitativer als auch quantitativer Beziehung einen verschwindend kleinen Teil der Bodenmikrobionten. Auch das Volumen der gesamten Bodenprotozoen steht hinter dem der Bodenbakterien sehr zurück. Ihre Fähigkeit, die unzähligen Mengen der Bakterien und anderen Mikroorganismen im normalen Boden zu vermindern, ist daher — auch bei günstigen Verhältnissen im Boden — gering. Dazu kommen noch die Schwierigkeiten, die ihrer Fortbewegung im Boden entgegenstehen, und der Umstand, daß mehrere Protozoenarten nur von ganz bestimmten Bakterien leben, und daß andere gar keine Bakterienfresser sind, vielmehr Protozoen verzehren oder, wie die am Abbau organischer Substanzen teilnehmenden, sich von vermodernden Pflanzen- und Tierresten nähren. Durch die partielle Sterilisierung werden die Protozoen nur zum Teil ausgerottet, da es Formen gibt, deren Cysten eine so große Menge von antiseptischen Mitteln erfordern, daß diese auch beim Sättigungsgrad des Bodens nicht erreicht wird. Die Protozoen sind aber im normalen Boden — auf Grund ihrer unbedeutenden Anzahl — auch vor der Sterilisierung für die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Bodenmikroben von untergeordneter Bedeutung.

Daß der Einfluß der Bodenprotozoen auch auf die mikrobiologischen Prozesse in normalem Boden unbedeutend ist, wurde ebenfalls durch direktes Studium des Stoffwechsels in verschiedenen Bodenproben bestätigt. Die partielle Sterilisierung rief Veränderungen chemischer, physikalischer und biologischer Natur in den untersuchten Bodenproben hervor, die eine bessere Zugänglichkeit des Bodenstickstoffs und eine bessere Ausnutzung der Nährstoffe durch die Pflanzen zur Folge hatten, ohne augenscheinliche Veränderungen in der Zahl der Protozoen zu bewirken. Die Ursachen der Verbesserung der Fruchtbarkeit des Bodens, die nach einer partiellen Sterilisierung stattfindet, sind also in anderen Faktoren als bei den Bodenprotozoen zu suchen.

Die Behauptung des Vorkommens vieler großer Protozoen im Boden und ihrer entscheidenden Bedeutung für die mikrobiologischen Prozesse im normalen Boden, wie auch ihrer Unabhängigkeit von der Feuchtigkeit, Reaktion, Temperatur des Bodens usw. durfte auf der indirekten Untersuchungsmethodik beruhen, bei welcher die Entwicklung der eigentlichen Bodenprotozoen ausbleibt, dagegen das Ausschlüpfen aus Cysten der für den Boden fremden Protozoen oder morphologisch stark veränderten Formen stattfinden kann.

Bei abnormen Verhältnissen im Boden, wie z. B. bei reichlichem Vorhandensein organischer Substanzen oder im durchweichten Boden, konnen natürlich die Protozoen infolge starker Vermehrung als hemmender Faktor für die Bakterienentwicklung und die Bakterienwirksamkeit auftreten. Solche Verhaltnisse sind aber sowohl unter theoretischem als auch unter praktischem Gesichtspunkt für die hier berührten Fragen ohne Interesse.

Literatur.

1) *A. Alexeieff*, C. r. Soc. Biol. **89**, 795, 1923. — 2) *Derselbe*, ebenda **89**, 882, 1923. — 3) *F. E. Allison*, Soil Sci. **3**, 1917. — 4) *R. V. Allison*, ebenda **18**, 1924. — 5) *Amster*, Centralbl. f. Bakt. I, **89**, 1922. — 6) *E. Andrejew*, Arch. f. Protistenkde. **63**, 1928. — 7) *Aubergier*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **81**, 1875. — 8) *S. Awerintzew*, Trav. Soc. Imp. Natur. St. Petersburg **36**, 1906. — 9) *Derselbe*, Zool. Anz. **31**, 243, 1907. — 10) *Derselbe*, ebenda **31**, 306, 1907.

11) *Chr. Barthel*, Meddel. Centralanst. försöksvas. jordbruksomr. **11**, 1909. — 12) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **48**, 1918. — 13) *C. D. Beers*, Brit. J. Exp. Biol. **1**, 1924. — 14) *Derselbe*, J. Exp. Zool. **51**, 121, 1928. — 15) *Derselbe*, **51**, 485, 1928. — 16) *M. W. Beijerinck*, Centralbl. f. Bakt. I, **19**, 1896. — 17) *Derselbe*, ebenda II, **4**, 1898. — 18) *N. Bengtsson*, Soil Sci. **18**, 1924. — 19) *E. Biilmann*, J. Agr. Sci. **14**, 1924. — 20) *E. Biilmann* u. *H. Lund*, Ann. Chim. **16**, 1921. — 21) *H. L. Bolley*, Science **32**, 1910. — 22) *Derselbe*, ebenda **38**, 48, 1913. — 23) *Derselbe*, ebenda **38**, 249, 1913. — 24) *R. Bouilhac*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **123**, 1896. — 25) *E. Bréal*, Ann. Agron. **22**, 1896. — 26) *B. M. Bristol-Roach*, Proc. and Pap. 1. Intern. Congr. Soil Sci. **3**, 1927. — 27) *B. M. Bristol* u. *H. J. Page*, Ann. Appl. Biol. **10**, 1923.

— 28) *A. L. Brodsky*, Protok. Sitz. 3. Kongr. russ. Zool. Anat. Hist. (Leningrad) 1927. — 29) *W. Buddin*, J. Agr. Sci. **6**, 417, 1914. — 30) *Derselbe*, ebenda **6**, 452, 1914.

31) *G. N. Calkins*, Arch. f. Entwicklungsmech. **15**, 1902. — 32) *Derselbe*, Biol. Bull. **8**, 1902. — 33) *Derselbe*, J. Exp. Zool. **1**, 1904. — 34) *Derselbe*, Amer. Natural. **49**, 1915. — 35) *G. N. Calkins* u. *C. C. Lieb*, Arch. f. Protistenkde. **1**, 1902. — 36) *A. Cauda* u. *G. Sangiorgi*, Centralbl. f. Bakt. II, **42**, 1915. — 37) *L. Celakowsky*, Flora od. allg. bot. Ztg. **76**, 1892. — 38) *A. Celli*, Centralbl. f. Bakt. I, **19**, 1896. — 39) *A. Celli* u. *R. Fiocca*, ebenda **16**, 1894. — 40) *H. Chaudhuri*, Ann. Protistol. **2**, 1929. — 41) *M. Chiritescu-Arva*, Protok. Sitz. 3. Komm. 2. Intern. Kongr. Bodenkde. (Moskwa) 1932. — 42) *N. Cholodny*, Arch. f. Mikrobiol. **1**, 1930. — 43) *H. H. Christensen* u. *H. L. Jensen*, Intern. Agr.-Wiss. Rundsch. N. F. **2**, 1926. — 44) *L. Cienkowsky*, Zeitschr. f. wiss. Zool. **6**, 1855. — 45) *Derselbe*, Arch. f. mikr. Anat. **1**, 1865. — 46) *Derselbe*, ebenda **12**, 1876. — 47) *E. Claparède* u. *J. Lachmann*, Études sur les infusoires et les rhizopodes 1858—1860. — 48) *L. R. Cleveland*, Proc. Nat. Ac. Sci. **9**, 1923. — 49) *Derselbe*, Am. J. Hyg. **3**, 1923. — 50) *Derselbe*, Biol. Bull. **46**, 1924. — 51) *Derselbe*, ebenda **48**, 282, 1925. — 52) *Derselbe*, ebenda **48**, 289, 1925. — 53) *Derselbe*, ebenda **48**, 295, 1925. — 54) *Derselbe*, ebenda **48**, 309, 1925. — 55) *Derselbe*, ebenda **54**, 1928. — 56) *L. C. Coleman*, Centralbl. f. Bakt. II, **20**, 1907/08. — 57) *H. J. Conn*, ebenda **32**, 1912. — 58) *Derselbe*, ebenda **42**, 1915. — 59) *Derselbe*, J. Bact. **1**, 1916. — 60) *Derselbe*, N. Y. Agr. Exp. Stat. Tech. Bull. **64**, 1918. — 61) *Derselbe*, Soil. Sci. **14**, 1922. — 62) *Derselbe*, ebenda **26**, 1928. — 63) *H. J. Conn* u. *W. C. Holmes*, Stain Technol. **3**, 1928. — 64) *A. Coppa*, Stat. Sper. Agr. Ital. **54**, 1921. — 65) *L. Crump*, J. Agr. Sci. **10**, 1920. — 66) *A. Cunningham*, Centralbl. f. Bakt. II, **42**, 1915. — 67) *A. Cunningham* u. *F. Lohnis*, ebenda **39**, 1913/14. — 68) *D. W. Cutler*, J. Agr. Sci. **9**, 1918/19. — 69) *Derselbe*, ebenda **10**, 1920. — 70) *Derselbe*, Ann. Appl. Biol. **10**, 1923. — 71) *Derselbe*, J. Quekett Microsc. Club. **15**, 1927. — 72) *D. W. Cutler* u. *D. V. Bal*, Ann. Appl. Biol. **13**, 1926. — 73) *D. W. Cutler* u. *L. M. Crump*, ebenda **7**, 1920. — 74) *Dieselben*, Biochem. J. **17**, 1923. — 75) *Dieselben*, Brit. J. Exp. Biol. **5**, 1927. — 76) *Dieselben*, Ann. Appl. Biol. **16**, 1929. — 77) *D. W. Cutler*, *L. M. Crump* u. *H. Sandon*, Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B, **211**, 1921—1923. — 78) *D. W. Cutler* u. *A. Dixon*, Ann. Appl. Biol. **14**, 1927.

79) *F. V. Darbishire* u. *E. J. Russell*, Chem. News. **94**, 1906. — 80) *Dieselben*, J. Agr. Sci. **2**, 1908. — 81) *H. Darby*, Arch. f. Protistenkde. **65**, 1929. — 82) *J. A. Dawson*, J. Exp. Zool. **51**, 1928. — 83) *E. Dianowa* u. *A. Woroschilowa*, Centralbl. f. Bakt. II, **84**, 1931. — 84) *C. Dobell*, Arch. f. Protistenkde. **34**, 1914. — 85) *N. Dogiel*, *E. Rammelmeyer* u. *A. Strelkow*, Bull. Bur. Agr. Micr. **2**, 1927. — 86) *A. W. Dox* u. *L. Maynard*, J. of biol. Chem. **12**, 1912. — 87) *K. Drewes*, Centralbl. f. Bakt. II, **76**, 1928/29. — 88) *R. J. Dubos*, Ekology **9**, 1928. — 89) *M. F. Dujardin*, Ann. Sci. Nat. Zool. Ser. **3**, **18**, 1852. — 90) *Dumas*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **81**, 1875. — 91) *B. Dyer*, Nature (London) **83**, 1910.

92) *W. Efimoff*, Arch. f. Protistenkde. **49**, 1924. — 93) *H. Egnér*, Meddel. Centralanst. försöksväs. jordbruksomr. **359**, 1929. — 94) *M. A. Egorow*, Russ. J. Exp. Landw. **9**, 1908. — 95) *C. G. Ehrenberg*, Die fossilen Infusorien und die lebendige Dammerde, 1837. — 96) *Derselbe*, Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen, 1838. — 97) *Derselbe*, Verh. Akad. Wiss. Berlin, 1841. — 98) *Derselbe*, ebenda, 1844. — 99) *Derselbe*, Microgeologie.

Leipzig, 1854. — 100) *Derselbe*, Monatsber. Akad. Wiss. Berlin, 1869. — 101) *Derselbe*, Die zweite deutsche Nordpolarfahrt in den Jahren 1869 und 1870 **2**, Leipzig 1874. — 102) *R. Emmerich, Graf W. zu Leiningen* u. *O. Löw*, Centralbl. f. Bakt. II, **31**, 1912. — 103) *R. Erdmann* u. *L. L. Woodruff*, Biol. Centralbl. **34**, 1914.

104) *P. Fabre-Domergue*, Ann. Sci. Nat. Zool. **5**, 1888. — 105) *H. B. Fantham* u. *E. Taylor*, S. Afr. J. Sci. **18**, 1922; **19**, 1922. — 106) *H. B. Fantham* u. *N. F. Paterson*, ebenda **20**, 1923; **21**, 1924. — 107) *T. V. Fedorowa-Winogradova*, Proc. 3. Congr. Russ. Zool. Anat. and Hist. (Leningrad) 1927. — 108) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **74**, 1928. — 109) *D. Fehér* u. *L. Varga*, ebenda **77**, 1929. — 110) *C. R. Fellers* u. *F. E. Allison*, Soil Sci. **9**, 1920. — 111) *Feuilletau de Bruyn*, Centralbl. f. Bakt. II, **56**, 1922. — 112) *H. Fischer*, ebenda **22**, 1909. — 113) *Derselbe*, ebenda **23**, 1909. — 114) *Derselbe*, Intern. Mitteil. f. Bodenkde. **13**, 1923. — 115) *Derselbe*, Act. 4. confer. intern. pédol. **3**, 1924. — 116) *F. Fletcher*, Nature (London) **83**, 1910. — 117) *Derselbe*, Cairo Sci. J. **4**, 1910. — 118) *Derselbe*, J. Agr. Sci. **4**, 1912. — 119) *Derselbe*, Nature (London) **90**, 1913. — 120) *R. H. Francé*, Centralbl. f. Bakt. II, **32**, 1912. — 121) *Derselbe*, Das Edaphon, 1921. — 122) *B. Frank*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **6**, 1888. — 123) *E. B. Fred*, Centralbl. f. Bakt. II, **31**, 1912. — 124) *Derselbe*, J. Agr. Res. **6**, 1916. — 125) *P. Frosch*, Centralbl. f. Bakt. I, **21**, 1897. — 126) *Derselbe*, Zeitschr. f. Krebsforsch. **8**, 1909.

127) *P. L. Gainey*, Missouri Bot. Gdn. 23. Ann. Rpt. 1912. — 128) *J. Gagliardi*, Quart. J. Micr. Sci. 1871. — 129) *J. v. Gelei*, Arch. f. Protistenkde. **52**, 1925. — 130) *T. Goodey*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **84**, 1912. — 131) *Derselbe*, Rpt. 83. Meeting Brt. Assoc. Adv. Sci. 1913. — 132) *Derselbe*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **86**, 1913. — 133) *Derselbe*, Arch. f. Protistenkde. **35**, 1914. — 134) *Derselbe*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **88**, 1915. — 135) *Derselbe*, Ann. Appl. Biol. **1**, 1915. — 136) *Derselbe*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **89**, 1916. — 137) *Derselbe*, Proc. Zool. Soc. (London) **31**, 1916. — 138) *P. H. H. Gray* u. *H. G. Thornton*, Nature (London) **122**, 1928. — 139) *J. E. Greaves*, Centralbl. f. Bakt. II, **41**, 1914. — 140) *R. Greeff*, Arch. mikr. Anat. **2**, 1866. — 141) *Derselbe*, Sitzungsber. Ges. Beförd. ges. Naturw. Marburg Nr. 2, 1888. — 142) *Derselbe*, ebenda Nr. 3, 1890. — 143) *Derselbe*, ebenda Nr. 1, 1891. — 144) *Derselbe*, Biol. Centralbl. **11**, 1891. — 145) *M. Greenwood*, J. Phys. **7**, 1886. — 146) *Derselbe*, ebenda **8**, 1887. — 147) *M. Greenwood* u. *E. R. Saunders*, ebenda **16**, 1894. — 148) *R. Greig-Smith*, Proc. Linn. Soc. New South Wales **35**, 1910. — 149) *Derselbe*, ebenda **36**, 609, 1912. — 150) *Derselbe*, ebenda **36**, 679, 1912. — 151) *Derselbe*, ebenda **37**, 238, 1912. — 152) *Derselbe*, ebenda **37**, 655, 1912. — 153) *Derselbe*, ebenda **38**, 1913. — 154) *Derselbe*, ebenda **39**, 1914. — 155) *Derselbe*, ebenda **40**, 631, 1915. — 156) *Derselbe*, ebenda **40**, 724, 1915. — 157) *Derselbe*, ebenda **42**, 1917. — 158) *Derselbe*, ebenda **43**, 1918. — 159) *A. B. Griffiths*, Proc. Roy. Soc. (Edinburgh) **16**, 1888/89. — 160) *Grosse-Allermann*, Arch. f. Protistenkde. **17**, 1909.

161) *A. D. Hall*, Science **32**, 1910. — 162) *Derselbe*, Ann. Rpts. Prog. Chem. (London) **6**, 1910. — 163) *G. T. Hargitt* u. *W. W. Fray*, J. Exp. Zool. **22**, 1917. — 164) *O. Harnisch*, Zool. Jahrbücher **51**, 1926. — 165) *M. Hartog* u. *A. E. Dixon*, Rpt. Brit. Assoc. Adv. Sci. **63**, 1893. — 166) *F. Heinis*, Zool. Anz. **33**, 1908. — 167) *Derselbe*, Arch. f. Hydrobiol. **5**, 1910. — 168) *T. L. Hills*, J. Bact. **1**, 1916. — 169) *L. Hiltner*, Jahresber. d. Verein. f. angew. Bot. **5**, 1907. — 170) *L. Hiltner* u. *K. Störmer*, Arb. d. Biol. Abt. Land- u.

Forstwirtschaft Kais. Gesundh. 8, 1903. — 171) *J. Hino*, Nôgaku Kwaihô [J. Sci. Agr. Soc. (Japan)], 289, 1926. — 172) *Derselbe*, Phytotechn. Inst. Miyazaki Coll. Agr. 12, — 173) *Derselbe*, ebenda 18. — 174) *Derselbe*, ebenda 29. — 175) *K. Hirai* u. *J. Hino*, J. Agr. Chem. 2, 1926. — 176) *K. Holdhaus*, Mitt. Sect. Nat. Österr. Tour. Club 28, 1911. — 177) *A. Howard* u. *G. L. C. Howard*, Nature (London) 82, 1910. — 178) *O. Huntemüller*, Arch. f. Hyg. 54, 1905. — 179) *C. M. Hutchinson*, Agr. J. India 6, 1911. — 180) *Derselbe*, Mem. Dep. Agr. India, Bact. Ser. 1, 1912. — 181) *Derselbe*, Rpt. Agr. Res. Inst. Col. Pusa 1914. — 182) *H. B. Hutchinson*, J. Agr. Sci. 5, 1913. — 183) *H. B. Hutchinson* u. *A. C. Thaysen*, ebenda 9, 1918.

184) *A. Itano* u. *G. Ray*, Soil Sci. 5, 1918. — 185) *M. Ivanič*, Zool. Anz. 74, 1927. — 186) *S. E. Jacobs*, Ann. Appl. Biol. 18, 1931. — 187) *H. J. Jensen*, J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales 45, 1911. — 188) *H. L. Jensen*, Soil Sci. 30, 1930. — 189) *Derselbe*, ebenda 31, 1931. — 190) *P. Jensen*, Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. 54, 1903. — 191) *D. H. Jones* u. *F. G. Murdoch*, Soil Sci. 8, 1919.

192) *J. Killer*, Centralbl. f. Bakt. II, 37, 1913. — 193) *O. Kleiber*, Arch. f. Naturg. 1, 1911. — 194) *A. Koch*, Arb. d. deutsch. landw. Ges. 40, 1899. — 195) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 31, 1911. — 196) *G. P. Koch*, J. Agr. Res. 4, 1915. — 197) *Derselbe*, ebenda 5, 1916. — 198) *Derselbe*, Soil Sci. 2, 1916. — 199) *M. Koffman*, Arch. mikr. Anat. Entwicklungsm. 103, 1924. — 200) *Derselbe*, Acta Zool. 7, 1926. — 201) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 75, 1928. — 202) *Derselbe*, ebenda 78, 1929. — 203) *Derselbe*, Meddel. Centralanst. försoksv. jordbruksomr. 391, 1931. — 204) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 85, 1931. — 205) *Derselbe*, Prot. Sitz. 3. Komm. 2. Intern. Kongr. Bodenkde. (Moskwa) 1932. — 206) *C. Kofoid*, Science 42, 1915. — 207) *N. Kopeloff*, Soil Sci. 1, 1916. — 208) *N. Kopeloff* u. *D. Coleman*, ebenda 3, 1917. — 209) *N. Kopeloff*, *H. C. Lint* u. *D. Coleman*, Transact. Amer. Micr. Soc. 34, 1915. — 210) *Dieselben*, J. Agr. Res. 5, 1915. — 211) *Dieselben*, Science 42, 1915. — 212) *Dieselben*, Centralbl. f. Bakt. II, 45, 1916. — 213) *Dieselben*, ebenda 46, 1916. — 214) *Dieselben*, Bot. Gaz. 61, 1916. — 215) *P. Kossowitsch*, Bot. Ztg. 52, 1894. — 216) *S. Kostytschev* u. *O. Schulgina*, Bull. Bur. Agr. Micr. (Leningrad) 2, 1927. — 217) *A. Krainsky*, Centralbl. f. Bakt. II, 41, 1914. — 218) *W. Kubienna*, Biol. Gener. 8, 1932. — 219) *Derselbe*, Arch. f. Mikrobiol. 3, 1932. — 220) *G. Kuhlmorgen-Hulle*, Centralbl. f. Bakt. II, 74, 1928.

221) *A. N. Lebedjantzev*, Soil Sci. 18, 1924. — 222) *A. van Leeuwenhoek* Phil. Trans. Roy. Soc. (London) 12, 1677. — 223) *Derselbe*, Continuatio Arcanorum Naturae, 1719. — 224) *J. Leidy*, Rpt. Unit. Stat. Geol. Survey terit. 12, 1879. — 225) *G. Lindner*, Biol. Centralbl. 19, 1899, — 226) *A. G. Lochead*, Proc. Trans. Roy. Soc. Canada 18, 1924. — 227) *Derselbe*, Soil Sci. 21, 1926. — 228) *C. A. Lodge* u. *R. G. Smith*, Ann. Rpt. Mass. Agr. Exp. St. 24, 1912. — 229) *O. Loew*, Ann. Rpt. Porto Rico Agr. Exp. Sta. 1910. — 230) *Derselbe*, ebenda 1913. — 231) *Derselbe*, Landw. Jahrb. 46, 1914. — 232) *F. Löhnis*, Centralbl. f. Bakt. II, 24, 1909. — 233) *Derselbe*, Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie, Berlin 1926. — 234) *F. Löhnis* u. *H. H. Green*, Centralbl. f. Bakt. II, 37, 1913. — 235) *Dieselben*, ebenda 40, 1914. — 236) *L. K. Losina-Losinsky*, Bull. Inst. Sci. Lesshaft. 15, 1929. — 237) *Derselbe*, Prot. Sitz. 3. Komm. 2. Intern. Kongr. Bodenkde. (Moskwa) 1932. — 238) *L. K. Losina-Losinsky* u. *P. E. Martinov*, Soil Sci. 29, 1930. — 239) *J. M. Luck*, *G. Sheets* u. *J. Thomas*, Quart. Rev. Biol. 6, 1931. — 240) *E. J. Lund*, J. Exp. Zool. 17, 1914. — 241) *A. Lwoff*, C. r. Ac. Sci.

Leipzig, 1854. — 100) *Derselbe*, Monatsber. Akad. Wiss. Berlin, 1869. — 101) *Derselbe*, Die zweite deutsche Nordpolarfahrt in den Jahren 1869 und 1870 **2**, Leipzig 1874. — 102) *R. Emmerich, Graf W. zu Leiningen* u. *O. Löw*, Centralbl. f. Bakt. II, **31**, 1912. — 103) *R. Erdmann* u. *L. L. Woodruff*, Biol. Centralbl. **34**, 1914.

104) *P. Fabre-Domergue*, Ann. Sci. Nat. Zool. **5**, 1888. — 105) *H. B. Fantham* u. *E. Taylor*, S. Afr. J. Sci. **18**, 1922; **19**, 1922. — 106) *H. B. Fantham* u. *N. F. Paterson*, ebenda **20**, 1923; **21**, 1924. — 107) *T. V. Fedorowa-Winogradova*, Proc. 3. Congr. Russ. Zool. Anat. and Hist. (Leningrad) 1927. — 108) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **74**, 1928. — 109) *D. Fehér* u. *L. Varga*, ebenda **77**, 1929. — 110) *C. R. Fellers* u. *F. E. Allison*, Soil Sci. **9**, 1920. — 111) *Feuilletau de Bruyn*, Centralbl. f. Bakt. II, **56**, 1922. — 112) *H. Fischer*, ebenda **22**, 1909. — 113) *Derselbe*, ebenda **23**, 1909. — 114) *Derselbe*, Intern. Mitteil. f. Bodenkde. **13**, 1923. — 115) *Derselbe*, Act. 4. confer. intern. pédol. **3**, 1924. — 116) *F. Fletcher*, Nature (London) **83**, 1910. — 117) *Derselbe*, Cairo Sci. J. **4**, 1910. — 118) *Derselbe*, J. Agr. Sci. **4**, 1912. — 119) *Derselbe*, Nature (London) **90**, 1913. — 120) *R. H. Francé*, Centralbl. f. Bakt. II, **32**, 1912. — 121) *Derselbe*, Das Edaphon, 1921. — 122) *B. Frank*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **6**, 1888. — 123) *E. B. Fred*, Centralbl. f. Bakt. II, **31**, 1912. — 124) *Derselbe*, J. Agr. Res. **6**, 1916. — 125) *P. Frosch*, Centralbl. f. Bakt. I, **21**, 1897. — 126) *Derselbe*, Zeitschr. f. Krebsforsch. **8**, 1909.

127) *P. L. Gainey*, Missouri Bot. Gdn. 23. Ann. Rpt. 1912. — 128) *J. Gagliardi*, Quart. J. Micr. Sci. 1871. — 129) *J. v. Gelei*, Arch. f. Protistenkde. **52**, 1925. — 130) *T. Goodey*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **84**, 1912. — 131) *Derselbe*, Rpt. 83. Meeting Brt. Assoc. Adv. Sci. 1913. — 132) *Derselbe*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **86**, 1913. — 133) *Derselbe*, Arch. f. Protistenkde. **35**, 1914. — 134) *Derselbe*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **88**, 1915. — 135) *Derselbe*, Ann. Appl. Biol. **1**, 1915. — 136) *Derselbe*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **89**, 1916. — 137) *Derselbe*, Proc. Zool. Soc. (London) **31**, 1916. — 138) *P. H. H. Gray* u. *H. G. Thornton*, Nature (London) **122**, 1928. — 139) *J. E. Greaves*, Centralbl. f. Bakt. II, **41**, 1914. — 140) *R. Greeff*, Arch. mikr. Anat. **2**, 1866. — 141) *Derselbe*, Sitzungsber. Ges. Beförd. ges. Naturw. Marburg Nr. 2, 1888. — 142) *Derselbe*, ebenda Nr. 3, 1890. — 143) *Derselbe*, ebenda Nr. 1, 1891. — 144) *Derselbe*, Biol. Centralbl. **11**, 1891. — 145) *M. Greenwood*, J. Phys. **7**, 1886. — 146) *Derselbe*, ebenda **8**, 1887. — 147) *M. Greenwood* u. *E. R. Saunders*, ebenda **16**, 1894. — 148) *R. Greig-Smith*, Proc. Linn. Soc. New South Wales **35**, 1910. — 149) *Derselbe*, ebenda **36**, 609, 1912. — 150) *Derselbe*, ebenda **36**, 679, 1912. — 151) *Derselbe*, ebenda **37**, 238, 1912. — 152) *Derselbe*, ebenda **37**, 655, 1912. — 153) *Derselbe*, ebenda **38**, 1913. — 154) *Derselbe*, ebenda **39**, 1914. — 155) *Derselbe*, ebenda **40**, 631, 1915. — 156) *Derselbe*, ebenda **40**, 724, 1915. — 157) *Derselbe*, ebenda **42**, 1917. — 158) *Derselbe*, ebenda **43**, 1918. — 159) *A. B. Griffiths*, Proc. Roy. Soc. (Edinburgh) **16**, 1888/89. — 160) *Grosse-Allermann*, Arch. f. Protistenkde. **17**, 1909.

161) *A. D. Hall*, Science **32**, 1910. — 162) *Derselbe*, Ann. Rpts. Prog. Chem. (London) **6**, 1910. — 163) *G. T. Hargitt* u. *W. W. Fray*, J. Exp. Zool. **22**, 1917. — 164) *O. Harnisch*, Zool. Jahrbücher **51**, 1926. — 165) *M. Hartog* u. *A. E. Dixon*, Rpt. Brit. Assoc. Adv. Sci. **63**, 1893. — 166) *F. Heinis*, Zool. Anz. **33**, 1908. — 167) *Derselbe*, Arch. f. Hydrobiol. **5**, 1910. — 168) *T. L. Hills*, J. Bact. **1**, 1916. — 169) *L. Hiltner*, Jahresber. d. Verein. f. angew. Bot. **5**, 1907. — 170) *L. Hiltner* u. *K. Störmer*, Arb. d. Biol. Abt. Land- u.

Forstwirtschaft Kais. Gesundh. 8, 1903. — 171) *J. Hino*, Nôgaku Kwaihô [J. Sci. Agr. Soc. (Japan)], 289, 1926. — 172) *Derselbe*, Phytotechn. Inst. Miyazaki Coll. Agr. 12, — 173) *Derselbe*, ebenda 18. — 174) *Derselbe*, ebenda 29. — 175) *K. Hirai* u. *J. Hino*, J. Agr. Chem. 2, 1926. — 176) *K. Holdhaus*, Mitt. Sect. Nat. Österr. Tour. Club 28, 1911. — 177) *A. Howard* u. *G. L. C. Howard*, Nature (London) 82, 1910. — 178) *O. Huntemüller*, Arch. f. Hyg. 54, 1905. — 179) *C. M. Hutchinson*, Agr. J. India 6, 1911. — 180) *Derselbe*, Mem. Dep. Agr. India, Bact. Ser. 1, 1912. — 181) *Derselbe*, Rpt. Agr. Res. Inst. Col. Pusa 1914. — 182) *H. B. Hutchinson*, J. Agr. Sci. 5, 1913. — 183) *H. B. Hutchinson* u. *A. C. Thaysen*, ebenda 9, 1918.

184) *A. Itano* u. *G. Ray*, Soil Sci. 5, 1918. — 185) *M. Ivanič*, Zool. Anz. 74, 1927. — 186) *S. E. Jacobs*, Ann. Appl. Biol. 18, 1931. — 187) *H. J. Jensen*, J. Proc. Roy. Soc. N. S. Wales 45, 1911. — 188) *H. L. Jensen*, Soil Sci. 30, 1930. — 189) *Derselbe*, ebenda 31, 1931. — 190) *P. Jensen*, Pflügers Arch. f. d. ges. Phys. 54, 1903. — 191) *D. H. Jones* u. *F. G. Murdoch*, Soil Sci. 8, 1919.

192) *J. Killer*, Centralbl. f. Bakt. II, 37, 1913. — 193) *O. Kleiber*, Arch. f. Naturg. 1, 1911. — 194) *A. Koch*, Arb. d. deutsch. landw. Ges. 40, 1899. — 195) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 31, 1911. — 196) *G. P. Koch*, J. Agr. Res. 4, 1915. — 197) *Derselbe*, ebenda 5, 1916. — 198) *Derselbe*, Soil Sci. 2, 1916. — 199) *M. Koffman*, Arch. mikr. Anat. Entwicklungsm. 103, 1924. — 200) *Derselbe*, Acta Zool. 7, 1926. — 201) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 75, 1928. — 202) *Derselbe*, ebenda 78, 1929. — 203) *Derselbe*, Meddel. Centralanst. forsoksv. jordbruksomr. 391, 1931. — 204) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, 85, 1931. — 205) *Derselbe*, Prot. Sitz. 3. Komm. 2. Intern. Kongr. Bodenkde. (Moskwa) 1932. — 206) *C. Kofoid*, Science 42, 1915. — 207) *N. Kopeloff*, Soil Sci. 1, 1916. — 208) *N. Kopeloff* u. *D. Coleman*, ebenda 3, 1917. — 209) *N. Kopeloff*, *H. C. Lint* u. *D. Coleman*, Transact. Amer. Micr. Soc. 34, 1915. — 210) *Dieselben*, J. Agr. Res. 5, 1915. — 211) *Dieselben*, Science 42, 1915. — 212) *Dieselben*, Centralbl. f. Bakt. II, 45, 1916. — 213) *Dieselben*, ebenda 46, 1916. — 214) *Dieselben*, Bot. Gaz. 61, 1916. — 215) *P. Kossowitsch*, Bot. Ztg. 52, 1894. — 216) *S. Kostytschev* u. *O. Schulgina*, Bull. Bur. Agr. Micr. (Leningrad) 2, 1927. — 217) *A. Krainsky*, Centralbl. f. Bakt. II, 41, 1914. — 218) *W. Kubienna*, Biol. Gener. 8, 1932. — 219) *Derselbe*, Arch. f. Mikrobiol. 3, 1932. — 220) *G. Kuhlmorgen-Hulle*, Centralbl. f. Bakt. II, 74, 1928.

221) *A. N. Lebedjantzev*, Soil Sci. 18, 1924. — 222) *A. van Leeuwenhoek* Phil. Trans. Roy. Soc. (London) 12, 1677. — 223) *Derselbe*, Continuatio Arcanorum Naturae, 1719. — 224) *J. Leidy*, Rpt. Unit. Stat. Geol. Survey terit. 12, 1879. — 225) *G. Lindner*, Biol. Centralbl. 19, 1899, — 226) *A. G. Lochead*, Proc. Trans. Roy. Soc. Canada 18, 1924. — 227) *Derselbe*, Soil Sci. 21, 1926. — 228) *C. A. Lodge* u. *R. G. Smith*, Ann. Rpt. Mass. Agr. Exp. St. 24, 1912. — 229) *O. Loew*, Ann. Rpt. Porto Rico Agr. Exp. Sta. 1910. — 230) *Derselbe*, ebenda 1913. — 231) *Derselbe*, Landw. Jahrb. 46, 1914. — 232) *F. Löhnis*, Centralbl. f. Bakt. II, 24, 1909. — 233) *Derselbe*, Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie, Berlin 1926. — 234) *F. Löhnis* u. *H. H. Green*, Centralbl. f. Bakt. II, 37, 1913. — 235) *Dieselben*, ebenda 40, 1914. — 236) *L. K. Losina-Losinsky*, Bull. Inst. Sci. Lesshaft. 15, 1929. — 237) *Derselbe*, Prot. Sitz. 3. Komm. 2. Intern. Kongr. Bodenkde. (Moskwa) 1932. — 238) *L. K. Losina-Losinsky* u. *P. E. Martinov*, Soil Sci. 29, 1930. — 239) *J. M. Luck*, *G. Sheets* u. *J. Thomas*, Quart. Rev. Biol. 6, 1931. — 240) *E. J. Lund*, J. Exp. Zool. 17, 1914. — 241) *A. Lwoff*, C. r. Ac. Sci.

(Paris) **176**, 1923. — 242) *Derselbe*, C. r. Soc. Biol. **91**, 1924. — 243) *Derselbe*, ebenda **98**, 1925. — 244) *Derselbe*, Monogr. Inst. Pasteur 1932.

245) *A. Maassen* u. *H. Behn*, Arb. Biol. Reichsanst. Land- u. Forstwirtschaft **12**, 1924. — 246) *M. Maltaux* u. *J. Massart*, Rec. Inst. Bot. Bruxelles **6**, 1906. — 247) *E. Marchal*, Bull. Ac. Roy. Sci. 3. Ser. **25**, 1893. — 248) *C. H. Martin*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **85**, 1912. — 249) *Derselbe*, Nature (London) **91**, 1913. — 250) *C. H. Martin* u. *K. R. Lewin*, Phil. Trans. Roy. Soc. (London) B, **205**, 1914. — 251) *Dieselben*, J. Agr. Sci. **7**, 1915/16. — 252) *S. O. Mast* u. *F. M. Root*, J. Exp. Zool. **21**, 1916. — 253) *O. Mattes*, Zool. Anz. **76**, 1928. — 254) *A. Matthews*, J. Agr. Sci. **14**, 1923. — 255) *P. A. Mawrodiadi*, Mem. Inst. Agr. Forest. Belarussie **9**, 1925. — 256) *J. Meiklejohn*, Ann. Appl. Biol. **17**, 1930. — 257) *Derselbe*, ebenda **19**, 1932. — 258) *Meissner*, Zeitschr. Wiss. Zool. **46**, 1888. — 259) *C. v. Mereschkowsky*, Arch. Mikr. Anat. **16**, 1878. — 260) *E. Metschnikoff*, Ann. Inst. Pasteur **3**, 1889. — 261) *V. Meunier*, C. r. Ac. Sci (Paris) **61**, 1865. — 262) *C. Miller*, Centralbl. f. Bakt. I, **16**, 1894. — 263) *T. Molér*, Bot. Notis. 1915. — 264) *H. Molisch*, Sitz.-Ber. Akad. Wiss. Wien **1**, 104, 1895. — 265) *Derselbe*, Pflanzenbiologie in Japan auf Grund eigener Beobachtungen, Jena 1926. — 266) *G. T. Moore*, Science **36**, 1912. — 267) *H. Mouton*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **133**, 1901. — 268) *Derselbe*, Ann. Inst. Pasteur **16**, 1902. — 269) *Derselbe*, Thèse, Paris 1902. — 270) *P. E. Müller*, Studien über die natürlichen Humusformen und deren Einwirkung auf Vegetation und Boden, Berlin 1887. — 271) *F. Münter*, Centralbl. f. Bakt. II, **36**, 1913. — 272) *Derselbe*, ebenda **39**, 1913/14. — 273) *A. Müntz* u. *H. Goudon*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **109**, 1889. — 274) *J. Murray*, Proc. Roy. Phys. Soc. (Edinburgh) **17**, 1908.

275) *K. Nägler*, Arch. f. Protistenkde. **15**, 1909. — 276) *S. M. Nasir*, Ann. Appl. Biol. **10**, 1923. — 277) *M. Nicolle* u. *E. Alilaire*, Ann. Inst. Pasteur **23**, 1909. — 278) *E. Nirenstein*, Zeitschr. f. allg. Phys. **5**, 1905. — 279) *M. Nowikoff*, Die Bodenprotozoen und ihre Bedeutung für die Bodenkultur, Heidelberg 1923.

280) *R. Oehler*, Arch. f. Protistenkde. **37**, 1916/17. — 281) *Derselbe*, ebenda **40**, 1919/20. — 282) *Derselbe*, **41**, 1920. — 283) *Derselbe*, ebenda **49**, 112, 1924. — 284) *Derselbe*, ebenda **49**, 287, 1924. — 285) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. I, **86**, 1921. — 286) *Derselbe*, ebenda **87**, 1922.

287) *S. S. Peck*, Exp. St. Hawaiian Sugar Planters Assoc. Bul. **34**, 1910. — 288) *E. Penard*, Arch. f. Protistenkde. **2**, 1903. — 289) *Derselbe*, ebenda **6**, 1905. — 290) *Derselbe*, J. R. Micr. Soc. **45**, 1907. — 291) *Derselbe*, Arch. f. Protistenkde. **17**, 1909. — 292) *Derselbe*, Rev. Suisse Zool. **18**, 1910. — 293) *Derselbe*, ebenda **20**, 1912. — 294) *Derselbe* Arch. f. Prostistenkde. **28**, 1913. — 295) *M. Perey*, Ann. Sci. Agron. **39**, 1922. — 296) *R. Peters*, J. Phys. **53**, 1919/20. — 297) *Derselbe*, ebenda **54**, 1920/21. — 298) *Derselbe*, ebenda **55**, 1921. — 299) *M. Pettenkofer*, Zeitschr. f. Biol. **7**, 1871. — 300) *W. Pfeffer*, Abh. math.-phys. Kl. königl. sächs. Ges. Wiss. **16**, 1891. — 301) *S. U. Pickering*, Nature (London) **76**, 1907. — 302) *Derselbe*, J. Agr. Sci. **2**, 1908. — 303) *Derselbe*, ebenda **3**, 32, 1908. — 304) *Derselbe*, ebenda **3**, 258, 1910. — 305) *Derselbe*, ebenda **3**, 277, 1910. — 306) *R. Pictet*, Rev. Sci. **52**, 1898. — 307) *M. Piettre* u. *P. de Souza*, C. r. Ac. Agr. France **9**, 1923. — 308) *R. Pistor*, Centralbl. f. Bakt. II, **80**, 1930. — 309) *E. Pleas*, Proc. Indiana Ac. Sci. Arts Letters **10**, 1896. — 310) *H. v. Post*, Kungl. Sv. Vet. Akad. Handl. **4**, 1861. — 311) *E. G. Pringsheim*, Biol. Centralbl. **35**, 1915. — 312) *Derselbe*, Beitr. Allg. Bot. **2**, 1921. — 313) *S. Prowazek*,

Zeitschr. f. wiss. Zool. **63**, 1897. — 314) *W. C. Purdy* u. *C. T. Butterfield*, Amer. J. Publ. Health **8**, 1918. — 315) *B. M. Puschkarew*, Arch. f. Protistenkde. **28**, 1913.

316) *O. Rahn*, Centralbl. f. Bakt. II, **36**, 1912/13. — 317) *Th. Remy*, ebenda **8**, 1902. — 318) *L. Rhumbler*, Zeitschr. f. wiss. Zool. **46**, 1888. — 319) *F. Richters*, Deutsche Südpolar-Expedition 1901 bis 1903, **9**, Zool. 1, Berlin 1907. — 320) *Alb. v. Rosenberg-Lipinsky*, Der Praktische Ackerbau **2**, 1869. — 321) *R. Ross* u. *D. Thomson*, Proc. Soc. Med. Sect. Epidem. 1916. — 322) *G. Rossi*, Festschr. anl. d. 70. Geburtstags v. Julius Stoklasa, 1928. — 323) *G. Rossi* u. *S. Riccardo*, Proc. Pap. 1. Intern. Congr. Soil Sci. (Washington) **3**, 1928. — 324) *E. J. Russell*, J. Agr. Sci. **1**, 1905. — 325) *Derselbe*, Nature (London) **83**, 1910. — 326) *Derselbe*, Science **37**, 1913. — 327) *Derselbe*, Nature (London) **90**, 1913. — 328) *Derselbe*, J. Board. Agr. (London) **21**, 1914. — 329) *Derselbe*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **89**, 1915. — 330) *Derselbe*, Ann. Sci. Agron. Franç. et Etrang. **6**, 1921. — 331) *E. J. Russell* u. *W. Buddin*, J. Soc. Chem. Ind. **32**, 1913. — 332) *E. J. Russell* u. *J. Golding*, ebenda **30**, 1911. — 333) *Dieselben*, J. Agr. Sci. **5**, 1912/13. — 334) *E. J. Russell* u. *H. B. Hutchinson*, ebenda **3**, 1909. — 335) *Dieselben*, ebenda **5**, 1913. — 336) *E. J. Russell* u. *F. R. Petherbridge*, J. Board. Agr. **18**, 1912. — 337) *Dieselben*, J. Agr. Sci. **5**, 1913.

338) *H. Sandon*, J. Linn. Soc. London. Zool. **35**, 1924. — 339) *Derselbe*, The composition and distribution of the protozoan fauna of the soil, 1927. — 340) *Derselbe*, Soil Sci. **25**, 1928. — 341) *H. Sandon* u. *D. W. Cutler*, J. Linn. Soc. London. Zool. **36**, 1924. — 342) *F. M. Scales*, Bot. Gaz. **60**, 1915. — 343) *F. Schaudinn*, Abh. Konigl. Akad. Wiss. (Berlin) 1899/1900. — 344) *E. Scheffelt*, Mitt. d. Bad. Landesver. f. Naturkde. u. Natursch. Freiberg i. Br. **1**, 1919. — 345) *Derselbe*, Zool. Anz. **52**, 1921. — 346) *Derselbe*, Mikrokosmos **15**, 1922. — 347) *W. Schewiakoff*, Zeitschr. f. wiss. Zool. **57**, 1894. — 348) *Th. Schloesing* u. *Em. Laurent*, Ann. Inst. Pasteur **6**, 1892. — 349) *A. Schneider*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **86**, 1878. — 350) *O. Schulgina*, Bull. Bur. Agr. Micr. (Leningrad) **2**, 1927. — 351) *D. J. Scourfield*, Proc. Zool Soc. (London) 1897. — 352) *F. J. Seaver* u. *E. D. Clark*, Biochem. Bull. **1**, 1912. — 353) *L. B. Sewertzoff*, Centralbl. f. Bakt. II, **65**, 1925. — 354) *L. B. Severtzova*, ebenda **73**, 1928. — 355) *N. N. Shapiro*, Trans. Amer. Micr. Soc. **66**, 1927. — 356) *M. Shibuya*, Proc. Imp. Acad. (Tokyo) **3**, 1927. — 357) *J. Sherman*, Centralbl. f. Bakt. II, **41**, 1914. — 358) *Derselbe*, J. Bact. **1**, 1916. — 359) *P. G. Shipley* u. *C. F. de Garis*, Science **62**, 1925. — 360) *C. E. Skinner*, Soil Sci. **24**, 1927. — 361) *Spiegel*, Arch. f. Hyg. **80**, 1913. — 362) *F. Stein*, Die Infusionstiere auf ihre Entwicklungsgeschichte untersucht, 1854. — 363) *Derselbe*, Der Organismus der Infusionstiere, 1859—1878. — 364) *F. Steinecke*, Schr. Phys.-Ökonom. Ges. (Königsberg) **54**, 1913. — 365) *F. L. Stevens* u. *W. A. Withers*, Centralbl. f. Bakt. II, **23**, 1909. — 366) *A. Štolc*, Zeitschr. f. wiss. Zool. **68**, 1900. — 367) *G. E. Stone*, 24. Ann. Rpt. Mass. Agr. Exp. Sta. 1912. — 368) *K. Störmer*, Jahresber. d. Ver. f. angew. Bot. **5**, 1907. — 369) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **20**, 1908. — 370) *A. Sun*, Arch. f. Protistenkde. **27**, 1912.

371) *L. de Telegdy-Kovats*, Ann. Appl. Biol. **19**, 1932. — 372) *Ch. Ternetz*, Jahrb. f. wiss. Bot. **44**, 1907. — 373) *H. G. Thornton* u. *G. Smith*, Proc. Roy. Soc. (London) B, **88**, 1914. — 374) *B. W. Troitzky* u. *S. Zérèn*, Centralbl. f. Bakt. II, **67**, 1926. — 375) *G. Truffaut*, Chim. Industr. **9**, 1923. — 376) *G. Truffaut* u. *N. Bezssonoff*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **171**, 1920. — 377) *J. Tsujitani*, Centralbl. f. Bakt. I, **24**, 1898.

378) *A. J. J. Vande Velde* u. *A. Verbelen*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **190**, 1930. — 379) *L. Varga*, Centralbl. f. Bakt. II, **86**, 1932. — 380) *P. Volz*, Arch. f. Protistenkde. **68**, 1929.

381) *S. Waksman*, Soil Sci. **1**, 135, 1916. — 382) *Derselbe*, ebenda **1**, 363, 1916. — 383) *Derselbe*, ebenda **2**, 363, 1916. — 384) *Derselbe*, ebenda **2**, 103, 1916. — 385) *Derselbe*, ebenda **8**, 1919. — 386) *Derselbe*, J. Bact. **7**, 1922. — 387) *Derselbe*, Soil Sci. **14**, 1922. — 388) *Derselbe*, Principles of Soil Microbiology, London 1927. — 389) *S. Waksman* u. *R. E. Curtis*, Soil Sci. **1**, 1916. — 390) *Dieselben*, ebenda **6**, 1918. — 391) *S. Waksman* u. *H. Heukelekian*, Act. 4. confér. intern. pédol. **3**, 1924. — 392) *S. Waksman* u. *R. Starkey*, Soil Sci. **16**, 1923. — 393) *Dieselben*, Act. 4. confér. intern. pédol. **3**, 1924. — 394) *H. Wallengren*, Zeitschr. f. allg. Phys. **1**, 1902. — 395) *C. C. Wang*, J. Morph. Phys. **46**, 1928. — 396) *C. L. Whittles*, J. Agr. Sci. **13**, 1923. — 397) *Derselbe*, ebenda **14**, 1924. — 398) *O. B. Williams*, Soil Sci. **19**, 1925. — 399) *G. Wimmer*, Zeitschr. f. Hyg. **48**, 1904. — 400) *T. W. Winogradoff* u. *M. P. Winogradoff*, Verh. Landw. Inst. (Leningrad) 1928. — 401) *S. Winogradsky*, C. r. Ac. Sci. (Paris) **177**, 1923. — 402) *Derselbe*, ebenda **178**, 1924. — 403) *Derselbe*, ebenda **179**, 367, 1924. — 404) *Derselbe*, Ann. Inst. Pasteur **39**, 1925. — 405) *A. Wojtkiewicz*, Centralbl. f. Bakt. II, **42**, 1915. — 406) *M. Wolff*, Mitt. K. Wilh.-Inst. f. Landw. (Bromberg) **1**, 1908. — 407) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **33**, 1912. — 408) *C. A. H. v. Wolzogen Kuhr Jr.*, Arch. Suikerind. Ned. Indie **25**, 1917. (Ref.: Chem. Abst. **12**, 1918). — 409) *L. L. Woodruff*, J. Exp. Zool. **2**, 1905. — 410) *Derselbe*, Amer. Natural. **42**, 1908. — 411) *Derselbe*, Biol. Bull. **17**, 1909. — 412) *Derselbe*, Arch. f. Protistenkde. **21**, 1911. — 413) *Derselbe*, J. Exp. Zool. **12**, 1912. — 414) *Derselbe*, Biochem. Bull. **1**, 1912. — 415) *Derselbe*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **9**, 1912. — 416) *Derselbe*, Biol. Centralbl. **33**, 1913. — 417) *Derselbe*, Amer. Natural. **59**, 1925. — 418) *Derselbe*, Quart. Rev. Biol. **1**, 1926. — 419) *L. L. Woodruff* u. *G. A. Baitsell*, J. Exp. Zool. **11**, 135, 1911. — 420) *Dieselben*, ebenda **11**, 339, 1911. — 421) *Dieselben*, Am. J. Phys. **29**, 1911.

422) *W. L. Yakimoff* u. *S. Zérèn*, Centralbl. f. Bakt. II, **63**, 1924. — 423) *Dieselben*, ebenda **67**, 1926.

424) *H. Zaubitzer*, Arch. f. Hyg. **40**, 1901. — 425) *Zumstein*, Jahrb. f. wiss. Bot. **34**, 1900.

(Aus der Abteilung für allgemeine Mikrobiologie des Instituts für experimentelle Medizin der USSR, Leningrad.)

Einige Beobachtungen über den Entwicklungszyklus des cellulosezersetzenden Organismus.

Von

B. L. Issatschenko und A. M. Wackenhut.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Februar 1934.)

Der von *H. B. Hutchinson* und *J. Clayton*[1] unter dem Namen *Spirochaeta cytophaga* beschriebene aerobe Cellulosezersetzer hat die Aufmerksamkeit einer Reihe von Forschern auf sich gelenkt. Einige Forscher haben sich auf Angaben über seine weite Verbreitung in der Natur beschränkt, andere den Entwicklungszyklus dieses interessanten Mikroorganismus untersucht.

Die Untersuchungen *Winogradskys* (1929)[2] zeichnen sich nicht nur durch vorzüglich ausgearbeitete Methodik der Zucht des *Hutchinson*schen Mikroorganismus in Kulturen aus, sondern erweitern unsere Kenntnisse über die Mannigfaltigkeit der zu dieser Gruppe gehörenden Mikroorganismen, über ihre physiologischen und biochemischen Eigentümlichkeiten um ein Bedeutendes. *Winogradsky* hat in seiner ausgezeichneten Arbeit eine Reihe der wesentlichsten Fragen behandelt, die auf die Cellulosezersetzung durch aerobe Organismen Bezug haben. Indem *Winogradsky* die Entwicklung der *Sp. cytophaga* untersuchte, kam er zu dem Ergebnis, daß die von *Hutchinson* beschriebenen kokkenartigen Zellen (Sporoide) nicht zu dem Entwicklungszyklus dieses Organismus gehören, wie die Autoren glaubten, sondern einen fremden kokkenartigen Organismus darstellen.

Da *Hutchinsons* Mikroorganismus nach seiner Körperform nicht zur Gattung *Spirochaeta* gestellt werden kann hat *Winogradsky* einen anderen Namen für ihn vorgeschlagen: *Cytophaga Hutchinsoni*, was als durchaus berechtigt anzusehen ist. — Später gelangte *H. Krzemieniewska* (1930)[3] zu dem Schluß, daß der Entwicklungszyklus von *Sp. cytophaga Hutchinson* aus zwei Formen besteht, und daß die in den Kulturen zusammen mit Stäbchen vorkommenden Kokken keineswegs ein fremder Organismus sind, sondern zu dem Entwicklungszyklus der *Spirochaeta* gehören, sowie endlich, daß *Sp. cytophaga* nach ihrem Entwicklungszyklus der Gattung *Myxococcus* der *Myxobacteriaceae* nahesteht.

Die Ergebnisse *Krzemieniewskas* sowie anderer Autoren, welche dem Mikroorganismus *Hutchinsons* Beachtung geschenkt haben (*R. Bokor*, *A. Kalnins* und *P. E. Simola*) wurden von *Winogradsky*[4] in einem kritischen Aufsatz besprochen, worin der Autor sich mit der Ansicht *Krzemieniewskas* über die Zugehörigkeit der kokkenartigen Formen zum Zyklus der *Cyto-*

[1] *H. Br. Hutchinson* u. *J. Clayton*, J. Agr. Sc. **9**, **143**, 1918/19. — [2] *S. Winogradsky*, Ann. Inst. Pasteur **43**, 549, 1929. — [3] *H. Krzemieniewska*, Act. Soc. Bot. Polon. **7**, 507, 1930. — [4] *S. Winogradsky*, Bull. Inst. Pasteur **30**, 1, 1932.

phaga nicht einverstanden erklärt. Dieser Umstand veranlaßte *H. Krzemieniewska*, in einem neuen Aufsatz (1933)[1] die Frage über den immer ratselhafter werdenden Organismus weiter zu vertiefen. Der Autor äußert sich mit Bestimmtheit in dem Sinne, daß der Organismus, welchen *Winogradsky* für *Spirochaeta cytophaga Hutch.* et *Clayt.* hielt und in *Cytophaga Hutchinsoni* (*Hutch.* et *Clayt.*) *Winogr.* umbenannte, in Wirklichkeit einen anderen, selbständigen Organismus darstellt, mit anderen Worten, daß *Sp. cytophaga Hutch.* und *Cyt. Hutchinsoni Winogr.*, trotz ihrer Ähnlichkeit im Stäbchenstadium, zwei verschiedene Organismen sind. Da aber der Entwicklungszyklus von *Sp. cytophaga* dem Zyklus von *Myxococcus* ahnlich ist, worauf der Autor bereits im vorhergehenden Artikel hingewiesen hat, besteht er darauf, daß dem Organismus *Hutchinsons* der von ihm vorgeschlagene Name *Cytophaga myxococcoides* anzueignen sei. Natürlich kommt es hier nicht auf den Namen an, sondern darauf, daß die „Microcysten“, wie *Krzemieniewska* das kokkenartige Stadium der *Spirochaeta* nennt, welches von *Hutchinson* (ob treffend oder nicht, ist eine andere Frage) als „sporoid“ bezeichnet wurde, zu dem Entwicklungszyklus *Sp. cytophaga—Cyt. myxococcoides* (*Hutch.* et *Clayt.*) *Krzem.* gehoren.

Rippel und *Flehming* (1933)[2] machen ihrerseits in einem Aufsatz, der kurz vor der soeben erwahnten Arbeit von *Krzemieniewska* erschien, einige Angaben daruber, daß das stabchenformige und das kokkenartige Stadium tatsächlich dem Entwicklungszyklus ein und desselben Organismus angehören. Indem die Autoren sich *Krzemieniewska* hinsichtlich der Ähnlichkeit des untersuchten Organismus (*Cytophaga*) mit *Myxococcus* anschließen, schlagen sie den Namen *Itersonia ferruginea* vor, da *van Iterson* bereits 1904 einen ganz analogen Organismus beschrieben hat, der Cellulose unter aeroben Bedingungen zersetzt.

Aus dieser kurzen Übersicht, welche nur die wesentlichsten Untersuchungen erwahnt, die in der allerletzten Zeit veroffentlicht wurden, kann ersehen werden, wie weit die Frage noch von der volligen Klärung entfernt ist. Es steht zweifellos noch viel Arbeit an der Methodik bevor, damit die Moglichkeit erreicht wird, den vollen Entwicklungszyklus des Organismus an einer Zelle einwandfrei zu verfolgen.

Unsere Aufmerksamkeit wurde auf den unter aeroben Verhältnissen Cellulose zersetzenden Organismus schon im Jahre 1926 gelenkt, und wir haben 1926 bis 1927 unsere Beobachtungen über seine Entwicklung unentwegt nachgeprüft. Die erzielten Ergebnisse führten uns schon damals zu dem bestimmten Schluß, daß der Entwicklungszyklus des Organismus, welcher uns vorlag, und den wir für identisch mit dem von *Hutchinson* und *Clayton* beschriebenen halten, sowohl Stäbchen als auch kokkenartige Formen (— Sporoid *Hutchinsons*) umfaßt.

Diese Ergebnisse wurden von uns schon damals einer ganzen Reihe unserer russischen Kollegen mitgeteilt. Unsere Beobachtungen wurden dargelegt und am 20. April 1932 dem „Archiv der biologischen Wissenschaften“ zum Abdruck übergeben, als die oben erwahnten Arbeiten von

[1] *H. Krzemieniewska*, diese Zeitschr. 4, 394, 1933. — [2] *A. Rippel* u. *T. Flehming*, Arch. f. Mikrobiol. 4, 229, 1933.

H. Krzemienieuwska und *Winogradsky* in Leningrad noch nicht eingetroffen waren, und wir zu jener Zeit bloß die Untersuchungen von *Winogradsky* (1929) vor uns hatten. Wir hoffen, daß dieser kleine Nachweis, der nur eine gewisse historische Bedeutung hat, nicht den Anschein erwecken kann, daß wir irgendwelche Prioritätsrechte anstreben; diese Absicht liegt uns fern! Unser in russischer Sprache veröffentlichter Aufsatz[1] ist vielen nicht zugänglich, und außerdem dürften die beigefügten Abbildungen den Leser in verschiedener Hinsicht nicht befriedigen und die Nachprüfung unserer Beobachtungen erschweren. Indem wir jetzt die Ergebnisse der Untersuchungen veröffentlichen, nehmen wir im Vergleich zum russischen Text keine Veränderungen vor und lassen nur das weniger Wesentliche fort.

Als Material für unsere ersten Untersuchungen diente ursprünglich ein im Jahre 1925 von *Issatschenko* dem See Berdjanskoe entnommener Heilschlamm. Bei Untersuchung der Cellulosezersetzung in Salzseen mußten wir Impfungen mit schwarzem Schlamm auf *Van Itersons* Nährboden für aerobe Bakterien mit Zusatz von NaCl in verschiedenen Konzentrationen ausführen. In einem der Kölbchen, in welches nur 2% NaCl[2] hinzugefügt worden war, verlief die Zersetzung der Cellulose (Filtrierpapier) besonders rasch; dieses Kölbchen diente für die weiteren Beobachtungen.

Wir können nicht mit Bestimmtheit behaupten, ob der aus dem See Berdjanskoe isolierte Organismus tatsächlich ein Bewohner dieses Sees ist oder zufällig vom Ufer aus in den aus dem See entnommenen Schlamm gelangt war, da die Proben unweit des Ufers genommen wurden; aber in diesem Falle ist das nicht so wichtig. Außer dem Material aus dem See verwandten wir später zwecks Erforschung der Entwicklung dieses eigenartigen Organismus Proben verschiedener Böden der Umgegend von Leningrad.

Die Cellulosezersetzung verlief rasch, und aus dem zersetzten Filtrierpapier konnten mehrere Formen isoliert werden, die sich voneinander durch das von ihnen gebildete Pigment unterschieden. Unsere Aufmerksamkeit wurde auf die Form gelenkt, die gelbes Pigment bildete, in der Färbung an Eidotter erinnernd. Mit Hilfe verschiedener Teilungsmethoden: Temperatur, Verdünnung und Impfung auf Agar mit Cellulose nach *Scales* oder auf Kieselplättchen mit Filtrierpapier nach der Methode *Winogradskys* erhielten wir, wie wir glauben, eine Reinkultur des Organismus.

Auf Agar nach *Scales* erschienen Aufhellungszonen, in denen jedoch keine Kolonien zu bemerken waren; betrachtet man aber ein

[1] *B. Issatschenko* u. A. *Wackenhut*, Einige Beobachtungen über den Entwicklungszyklus eines die Cellulose zersetzenden Organismus. Archives d. Sc. biologiques. XXXII, 484, 1932. — [2] Später wurden zu dem von *Hutchinson* vorgeschlagenen Medium nur Spuren von NaCl hinzugefügt, was auf die Entwicklung des Organismus keinen Einfluß hatte.

Stück Agar aus dieser Zone unter dem Mikroskop, so kann man sich leicht überzeugen, daß sich darin eine Menge spirillenartiger Zellen und derjenigen rätselhaften Sporoide befindet, die von *Hutchinson* beschrieben und abgebildet wurden. Es ist wohl nicht nötig zu erwähnen, daß wir diese Sporoide zuerst für einen fremden Organismus hielten, der zufällig in die Kultur des spirillenartigen Organismus gelangt war; lange Zeit bemühten wir uns, die Kultur von diesen Gebilden zu befreien, bis eine Reihe von Beobachtungen und Gegenüberstellungen uns nach und nach bewog, diese Ansicht aufzugeben, und vielfach wiederholte Beobachtungen an der Entwicklung des Organismus im hängenden Tropfen uns zur Überzeugung brachten, daß die Sporoide augenscheinlich tatsächlich zu dem Entwicklungszyklus unseres Organismus gehören, der nach allen seinen Merkmalen mit *Spirochaeta cytophaga Hutchinson* et *Clayton*, der *Cytophaga Winogradsky*'s, durchaus identisch ist. Bekanntlich haben englische Forscher bei *Spirochaeta* das Auftreten von Körnchen beobachtet, die von ihnen als mit der Kernsubstanz (nuclear substance) identisch angesehen werden, ferner eine Auftreibung der Zellen und Bildung runder oder leicht ovaler Formen, welche nichts anderes sind als Sporoide; diese bilden von neuem spirillenartige Zellen. Alle unsere Beobachtungen bestätigen im allgemeinen alles, was *Hutchinson* und *Clayton* beobachtet haben, und geben gleichzeitig ein klares Bild der Entwicklung der eigenartigen „*Spirochaeta*“-*Cytophaga*.

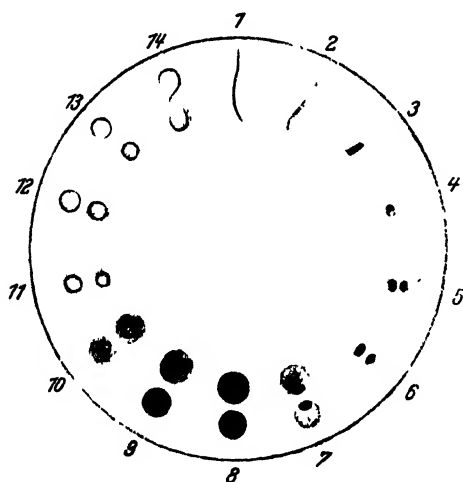


Abb. 1
Schema des Entwicklungszyklus von *Cytophaga*.
Erklärung im Text.

In Probiergläschen mit Filtrierpapier auf *Hutchinsons* Substrat trat eine merkliche Entwicklung der *Spirochaeta* schon nach 24 bis 36 Stunden ein. Zwecks Beobachtung der ersten Entwicklungsstadien des Organismus nahmen wir 6 bis 8 Stunden vor Eintritt der merklichen Gelbfärbung des Papiers einzelne Papierfasern von der Stelle, die sich an der Grenze des flüssigen Mediums befand. Dabei waren an dem Papier ausschließlich spirillenartige Zellen, isolierte oder in Querteilung befindliche, wahrgenommen worden. Zu dieser

Zeit sehen die Zellen sehr kurz aus, aber später, mit dem Auftreten der Gelbfärbung des Papiers, werden ihre Längenmaße größer [Abb. 1 (1, 2), Abb. 2], und es erscheint ein sich intensiver färbender mittlerer Teil in ihnen (in Gestalt eines mehr oder weniger länglichen Einschlusses): wir identifizieren ihn mit der „Chromatinsubstanz" *Hut-*

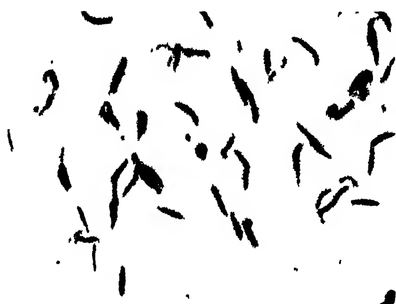


Abb. 2.
24stündige Kultur.



Abb. 3.
48stündige Kultur.
Chromatinsubstanz im Stadium der Teilung.

chinsons [Abb. 1 (3)] (Färbung mit Erythrosin, Carbolfuchsin u. a.). Nach weiteren 6 bis 8 Stunden wächst die Zahl solcher Zellen, und es sind gequollene anzutreffen, deren Breite die Breite der normalen Zellen 2 bis $2^1/_2$mal übertrifft. Der sich färbende mittlere Teil verkurzt sich dabei gleichsam, allmählich eine ovale und dann kugelige Form annehmend [Abb. 1 (4)]. Nach weiteren 6 Stunden sind Zellen zu sehen, in denen der Einschluß die „Chromatinsubstanz" *Hutchinsons* — schon verschiedene Stadien der Teilung durch eine Einschnürung zeigt [Abb. 1 (5, 6), Abb. 3, 4]: es kommen auch geteilte Zellen vor mit den auf sie entfallenden Teilchen des „Chromatins", die sich bei schwach gefärbtem Körper des Organismus gut färben. Es fällt auf, daß der dem „chromatintragenden" Ende entgegengesetzte Zellkörper gleichsam verschwimmt oder aufgelöst ist. Allmählich rundet der übrig gebliebene Teil der Zelle sich um den Chromatinkörper herum ab, so daß schließlich ein rundlicher Körper, der „Sporoid", entsteht. In seinem Innern ist anfangs noch ein „Chromatinkörperchen" zu sehen [Abb. 1 (7)], später aber gewinnt mit seinem Verschwinden der ganze Körper des

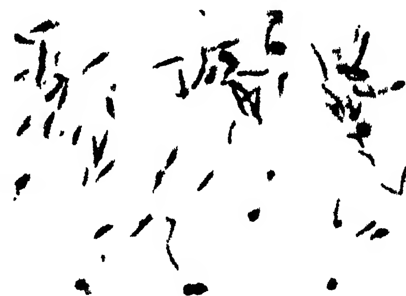


Abb. 4.
54stündige Kultur.

„Sporoids“ eine homogene Struktur, durch sein ganzes Aussehen an einen sich gut färbenden Kokkus erinnernd [Abb. 1 (8), Abb. 5]. Eine 3 mal 24 Stunden alte Kultur enthält eine Menge Sporoide und unverändert gebliebene spirillenartige Zellen. Diese übriggebliebenen spirillenartigen („sterilen“) Zellen erleiden später eine Autolyse, die darin besteht, daß ihr Inhalt in einzelne, schwer färbbare Körnchen zerfällt, zwischen denen sich eine fast gar nicht färbbare Masse („Schleim“) befindet. 8 bis 9 Tage alte Kulturen enthalten keine Spirillen mehr, sondern nur Sporoide und formlosen Schleim (Abb. 6).

Um das Schicksal der „Sporoide“ zu verfolgen, wurden solche Probierglaskulturen gewählt, die enorme Mengen von „Sporoiden“ in dem Stadium enthielten, wo sie das Aussehen vollständig runder, gut umschriebener, homogener, sich gleichmäßig färbender Körper



Abb. 5
„Sporoiden“ an einer Filtrierpapierfaser. Unter ganz ausgebildeten sind auch junge mit deutlicher Struktur zu sehen.

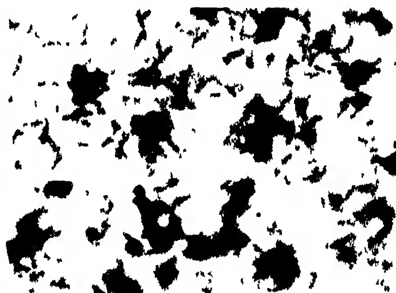


Abb. 6.
Autolyse „steriler“ spirillenartiger Zellen.

haben. Aus den Probiergläschen mit solchen Kulturen wurde mit der größten Vorsicht die Nährflüssigkeit abgegossen, während die Stücke des Papiers (das sich im Niveau der Flüssigkeit geteilt hatte) mit Hilfe einer Platinnadel an den Wänden des Glases in ihrer früheren Lage festgehalten wurden. Danach wurde das Probierglas bis zur früheren Höhe mit frischer Nährflüssigkeit gefüllt und im Thermostat untergebracht. Nach 8 bis 10 Stunden konnte in Präparaten aus solchen Kulturen eine bedeutende Menge von Sporoiden beobachtet werden, die aber schon weniger leicht färbbar waren; in ihnen war, näher zur Peripherie, das Auftreten je eines deutlich ausgeprägten Ringes zu bemerken. Manchmal lagen jedoch diese Ringe näher zum zentralen Teil des „Sporoids“ [Abb. 1 (9)].

Noch später, nach 12 Stunden, wuchs die Zahl der „Sporoide“ mit einem Ring im Innern, stark an, während die Zahl der homogenen Zellen unbedeutend wurde. Die Ringe in den „Sporoiden“ traten zu dieser Zeit schon ganz deutlich hervor; ihr Durchmesser erschien

vergrößert [Abb. 1 (10)] und wuchs weiter, während der Körper des „Sporoids“ immer schlechter färbbar wurde.

26 bis 30 Stunden nach Ersatz der alten Nährflüssigkeit durch frische war in den Präparaten bereits eine große Menge ringförmiger Zellen mit Überresten formlosen Schleimes an der äußeren und inneren Seite zu sehen [Abb. 1 (11, 12)]. Manche Ringe hatten sich gleichsam vom Schleim befreit und hatten das Aussehen deutlich ausgeprägter Kreise von 0,9 bis 1 μ Durchmesser. In denselben Präparaten waren Ringe anzutreffen, deren Peripherie an irgendeiner Stelle geplatzt war [Abb. 1 (13)]. Etwas später waren in den Präparaten immer häufiger Ringe mit auseinandergegangenen Enden vorhanden, die in manchen Fällen nicht nur auseinandergingen, sondern auch sich umbogen, wobei ihre Länge vergrößert erschien [Abb. 1 (14)]. 36 Stunden später waren die Präparate mit einer großen Zahl von Zellen angefüllt, welche die Form eines Hufeisens, Fragezeichens oder eines ganz aufgerollten Ringes hatten und spirillenartige Zellen mit stumpfen Enden darstellten. Diese spirillenartigen Zellen hatten geringere Dimensionen als diejenigen, die sich gewöhnlich bei der ursprünglichen Impfung auf Papier entwickeln.

In dieser Form bleibt die Kultur unverändert. Frische Nährflüssigkeit ist nötig, damit weitere Veränderungen beobachtet werden können. Wenn also das beschriebene Material in frisches Substrat gebracht wird, kann ein schnelles Sichauseinanderrollen der Zellen bemerkt werden: ihre Dimensionen nehmen bis zu der gewöhnlichen Größe dieses Organismus zu [Abb. 1 (1)]. Das Papier, auf welches übergeimpft wurde, nimmt nach 6 bis 8 Stunden eine leicht gelbliche Farbe an: „Sporoide“ sind an ihm gar nicht zu sehen, sondern eine außerordentlich große Zahl spirillenartiger Zellen, d. h. die Kultur hat das gewöhnliche Aussehen frischer Impfungen.

Bei Beobachtung der „Sporoide“ im lebenden Zustand im hängenden Tropfen kann ein Ring in ihnen ohne Färbung nicht wahrgenommen werden, und die unter dem Mikroskop bemerkbaren Veränderungen beschränken sich auf Abnahme der Lichtbrechungsfähigkeit des Sporoids und der Klarheit seiner Konturen. Aber in manchen Fällen konnten in den „Sporoiden“, wenn auch mit Mühe, ringförmige Gebilde erkannt werden, die das Licht etwas stärker brechen als der übrige Körper des „Sporoids“. Möglicherweise hängt das davon ab, welche Stellung der „Sporoid“ im Präparat in bezug auf den Beobachter einnimmt. In den Fällen, wo der innere Ring bemerkbar war, wurde es klar, daß ein Auseinanderreißen des Ringes und ein Hervortreten eines oder, seltener, beider frei gewordener Enden aus dem Schleim stattfindet. Wenn dagegen im lebenden „Sporoid“ kein Ring zu sehen war, entstand der Eindruck, daß aus dem „Sporoid“ irgendein Auswuchs hervortritt, oder daß die Hülle des „Sporoids“ sich vom Inhalt löst.

Beobachtungen an spirillenartigen Zellen im hängenden Tropfen zeigten, daß zu gewissen Zeiten die Spirillen sich allmählich verdicken, weniger sichtbar werden und in der Breite auf das 2 bis 3fache zunehmen, während der mittlere Teil einer solchen Zelle sich verengt, eine Einschnürung bildet, so daß die Zelle in zwei anfangs ovale, später sich abrundende Körper zerfällt: die „Sporoiden". Die in gefärbten Präparaten gut sichtbare Chromatinsubstanz bleibt hier unsichtbar. Umgekehrt zeigten in einer feuchten Kammer untergebrachte „Sporoide" deutlich das Bild der sich streckenden, in schleimartige Substanz gebetteten ringförmigen Zellen und ihr Heraustreten aus dem allmählich verschwindenden Schleim als spirillenartige Zellen.

Auf diese Weise konnte eine gewisse Vorstellung von der Entwicklung des interessanten Organismus gewonnen werden, indem von Beobachtungen im hängenden Tropfen zu Beobachtungen in Probiergläschen unter Erneuerung der Nährflüssigkeit übergegangen wurde. Es gelingt nicht, alle Übergangsstadien von der ursprünglichen spirillenartigen Zelle zum Sporoid und dann wieder von diesem zur spirillenartigen Zelle an einer Zelle im hängenden Tropfen zu verfolgen, wie überhaupt Beobachtungen der Entwicklung von Organismen mit etwas komplizierterem Zyklus, für dessen Vollendung Veränderungen im umgebenden Medium erforderlich sind, nicht immer gelingen.

Zusammenfassung.

1. Der von uns untersuchte Organismus ist mit *Sp. cytophaga Hutchinson* und *Clayton* identisch. — 2. Der Entwicklungszyklus umfaßt ein stäbchenförmiges Stadium und eine daraus entstehende Form, die das Aussehen eines Kokken hat (— Sporoid *Hutchinsons*). — 3. Die kokkenartige Form (= Sporoid) stellt einen Körper von schleimiger Konsistenz dar, die sich unter der Einwirkung von Sodalösung verändert. — 4. In frischer Nährlösung kommen aus den schleimigen, kokkenartigen Zellen stäbchenartige Formen hervor, die analog sind den Formen, die in den ersten Tagen der Entwicklung des Organismus beobachtet werden. — 5. Alle Entwicklungsstadien dieses Organismus lassen sich durch Kombination von Beobachtungen in Probiergläsern auf Filtrierpapier mit Beobachtungen im hängenden Tropfen auf Filtrierpapierfasern verfolgen. — 6. Dieser Organismus ist sehr weit verbreitet, indem er sowohl in verschiedenen Bodenarten und in Salzseen der gemäßigten Zone als auch im arktischen Gebiet vorkommt, wo er von uns auf Franz-Joseph-Land, Nowaja Zemlja, Severnaja Zemlja und im Wasser des Barentsmeeres gefunden wurde. — 7. Wir behalten für ihn den von *Winogradsky* gegebenen Namen bei: *Cytophaga Hutchinsoni*, da keine Gründe vorliegen, seine Identität mit *Spirochaeta* anzunehmen.

(Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule Graz.)

Über die Bildung von Lipoiden durch Bakterien.

I. Mitteilung:

Die Gesamtfettbildung von Bacillus prodigiosus auf festen Nährmedien.

Von

G. Gorbach und A. Sablatnög.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Februar 1934.)

Die lebende Zelle enthalt immer Stoffe, welche sich durch ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie Äther, Chloroform, Alkohol, Aceton und Benzol auszeichnen. Man hat diese Stoffgruppe nach *Overton*[1] unter dem Namen „Lipoide" zusammengefaßt. Da nur die Löslichkeit zu dieser Begriffsbestimmung herangezogen wird, ist natürlich die Stoffgruppe nicht einheitlich. Sie enthält neben echten Fetten und Fettsäuren hochmolekulare Alkohole, Wachse, Farbstoffe, stickstoff- und phosphorhaltige Produkte. Die chemische Konstitution und die Bedeutung dieser Stoffe für die lebende Zelle aufzuklären, war das Ziel zahlreicher Untersuchungen. Danach haben die Lipoide neben der Aufgabe, als Nahrungs- und Reservestoffe zu dienen, eine Reihe wichtiger Funktionen im Stoffwechsel des Organismus zu erfüllen, welche sie ganz allgemein als *Stoffwechselregulatoren* charakterisieren[2]. Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Lipoide unterliegt großen Schwankungen; sie werden durch die Eigenart der Zelle einerseits und durch die Ernährung andererseits bedingt. Während die wissenschaftliche Erforschung der Lipoide höher organisierter Lebewesen seit langem auf breitester Basis eingesetzt hat, sind solche Untersuchungen an Mikroorganismen nur in Einzelfällen ausgeführt worden. Die zu starker Verfettung neigende *Hefe* und einzelne an Lipoiden reiche *Bakterien*-Arten sind in dieser Hinsicht noch am besten untersucht. Die meisten Arbeiten mit Bakterien unterrichten über die Zusammensetzung der Lipoide[3], während es an eingehenden Untersuchungen über den Einfluß der Ernährungsbedingungen auf die Lipoidbildung mangelt. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von *E. Terroine* und *I. Lobstein*[4], welche den Einfluß der Kohlenhydrate bei *Tuberkelbazillen* untersuchten, und jene von *E. Eckstein* und *M. Soule*[5], die sich mit dem von l-Cystin und d-Alanin bei *Bac. coli* beschäftigten.

Bei der Bedeutung der Lipoide für den gesamten Stoffwechsel scheint es angebracht, eingehende Untersuchungen über die Lipoidbildung bei Bakterien anzustellen. Wir haben daher mit systematischen

[1] *E. Overton*, Studien über die Narkose. Jena, G. Fischer, 1901. — [2] *W. Halden*, Fettchemische Umschau 40, 189, 1933. — [3] *E. Chargaff*, Naturwiss. 19, 202, 1931, mit eingehenden Literaturangaben. — [4] *E. Terroine* u. *I. Lobstein*, Bull. soc. chim. biol. 5, 182, 1923. — [5] *H. Eckstein* u. *M. Soule*, J. of biol. Chem. 91, 395, 1931.

Versuchen in dieser Richtung begonnen und wählten hierzu einen farblos wachsenden Stamm des *Bac. prodigiosus*, der uns aus dem Hygienischen Institut der Universität Innsbruck zur Verfügung stand. Die Farblosigkeit war uns insofern erwünscht, als wir dadurch in die Lage kamen, die farblosen Lipoide dieser Bakterienart zu studieren, ohne dabei durch das Vorhandensein des gefärbten Lipoids „Prodigiosin" nennenswert gestört zu werden. Über die Farbstoffbildung des Bakteriums hat der eine von uns schon früher systematische Untersuchungen ausgeführt[1]. Abgesehen von der mangelnden Farbstoffbildung zeigte unser Stamm das bei *Lehmann-Neumann*[2] beschriebene Verhalten.

Die Notwendigkeit, Serienversuche zu machen, veranlaßte uns, eine mikrochemische Extraktionsmethode auszuarbeiten[3], da die bekannten makrochemischen Arbeitsmethoden viel Bakterienmaterial erfordern, welches nur unter großem Zeit- und Geldaufwand zu erhalten ist. Zum vollständigen Aufschluß der Bakterienzelle verwendeten wir die Autolyse mit Toluol. Durch Konstruktion einer quantitativen Extraktionsapparatur gelang es, bereits mit wenigen Milligrammen des Bakterienmaterials einwandfreie Gesamtfettbestimmungen auszuführen.

Methodik der Zuchtversuche.

Die Wasserstoffionenkonzentration bestimmten wir kolorimetrisch nach der Methode von *Michaelis*[4] für gefärbte und getrübte Flüssigkeiten. Die Einstellung des p_H-Wertes erreichten wir durch Zugabe eines entsprechenden Phosphatpuffergemisches nach *S. P. L. Sörensen* oder durch verdünnte Salzsäure bzw. Natronlauge. Zur Zucht verwendeten wir natürliche und synthetische Nährsubstrate. Jene bestanden aus Pferdefleischextrakt (1 kg Fleisch + 2 Liter Wasser) mit einem Zusatz von 0,5 % Pepton (siccum *Witte*, Rostock), 1 % Glycerin und 1 % Kochsalz. Für diagnostische Zwecke und zur Weiterführung des Bakterienstammes wurden 10 % Gelatine (Marke Gold) bzw. 2 % ausgefaulter Agar zugegeben, im Dampfschrank gelöst, dann neutralisiert und in der üblichen Weise mit Eiweiß geklärt. Als Grundlage für die synthetischen Nährmedien diente eine mineralische Nährlösung[5], welche im Liter enthielt:

12	ccm	0,5 mol.	$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$
12	„	0,5 „	$NaCl$
40	„	0,5 „	KH_2PO_4
80	„	0,5 „	K_2HP_4
0,5	„	0,1 „	$CaCl_2$
Summe: 144,5	ccm		

Durch Zugabe von primärem und sekundärem Phosphat hatte die Nährlösung automatisch den p_H-Wert 7,0. Sie wurde mit destilliertem

[1] *G. Gorbach*, Centralbl. f. Bakt. II, 79, 33, 1929. — [2] *Lehmann-Neumann* 2, 458, München 1927. — [3] *G. Gorbach*, Mikrochem. 12, 162, 1932. — [4] *L. Michaelis*, Abderhaldens Handb., Teil A, H. 3, S. 487, 1923. — [5] *G. Gorbach*, Arch. f. Mikrobiol. 1, 545, 1931.

Wasser auf 400 ccm ergänzt, so daß zur Auflösung der entsprechenden Stickstoff- und Kohlenstoffquellen und zur eventuellen Einstellung des p_H-Wertes noch 600 ccm verblieben. Für die Lipoidversuche auf festen Nährsubstraten wurden die angegebenen Lösungen mit 6% ausgefaultem Agar versetzt. Die festen Unterlagen erlaubten eine reinliche Scheidung von Bakterienmaterial und Nährmedium. Auf eine Klärung solcher Nährböden mit Eiweiß wurde verzichtet, da sich so hochvisköse Lösungen nicht gut filtrieren lassen und klare Nährmedien für unsere Versuche nicht notwendig waren.

Für die Zuchtversuche auf festen Nährsubstraten verwendeten wir *Koch*sche Kulturschalen mit einem Durchmesser von etwa 22 bis 25 cm, die wir nach Sterilisation im Trockenschrank bei 150° mit dem sterilen Nährboden etwa 1 cm hoch beschickten. Zu den Versuchen mit Nährlösungen dienten *Erlenmeyer*-Kolben von 200 ccm Inhalt. Sie wurden ebenfalls sterilisiert und mit 150 ccm steriler Nährlösung gefüllt. Zur gleichmäßigen Beimpfung der festen Nährmedien wurde eine 24 Stunden alte Agarkultur in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt; von dieser Bakteriensuspension wurden 2 bis 4 ccm (je nach der Größe der Schale) auf die sterile Nährbodenfläche gegossen und durch leichtes Schwenken der Schale auf der ganzen Fläche gleichmäßig verteilt. Auch zur Beimpfung der Nährlösungen benutzten wir solche Aufschwemmungen, um bei Serienversuchen möglichst gleichviel Bakterienkeime zu verimpfen. Nur ließen wir sie in diesen Fällen $^1/_4$ Stunde stehen, damit sich immerhin vorhandene größere Bakterienverklumpungen niederschlagen konnten. Erst dann senkten wir eine stets gleichbleibende Platinöse stets gleich tief ein und impften damit.

Gewinnung und Vorbereitung des Bakterienmaterials.

Von den Agarnährböden konnte das Bakterienmaterial durch einfaches Abziehen mittels eines breiten Spachtels gewonnen werden. Aus Nährlösungen ließ es sich am besten durch Zentrifugieren erhalten. Um Reste der Nährlösung zu entfernen, wuschen wir die auszentrifugierte Bakterienmasse mit Wasser. Dem feuchten Bakterienmaterial setzten wir einige Tropfen Toluol zu und überließen das Ganze einer 24stündigen Autolyse bei Zimmertemperatur. Die autolysierte Bakterienmasse trockneten wir im Vakuum und zerrieben sie in einem geeigneten kleinen Stahlmörser bis zur Staubfeinheit. Wie die mikroskopische Untersuchung erwies, wurden dadurch sämtliche Bakterienzellen zerdrückt. Nach einer weiteren Trocknung im Vakuum wurde das Material ausgewogen und mit Äther extrahiert. Im übrigen sei auf die bereits zitierte Mitteilung[1] verwiesen.

Versuchsreihen.

I. Einfluß der Zuchttemperatur auf die Lipoidbildung. Wir beimpften eine Reihe Fleischagarnährböden und ließen sie im Thermostaten bei 20° stehen. Schon nach dreitägiger Zucht bildeten sich gut sichtbare Bakterienrasen, deren Schichtdicke innerhalb von 14 Tagen ständig zunahm. Nach dieser Zeit trockneten sie allmählich ein und wurden durchscheinend. Nach bestimmten Tagen der Zucht ent-

[1] *G. Gorbach*, Mikrochem. 12, 162, 1932.

nahmen wir einen Teil des Bakterienmaterials und bestimmten den Lipoidgehalt. Die Ergebnisse sind aus der graphischen Darstellung Abb. 1 zu entnehmen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen werden nur kleine Lipoidgehalte erzielt: nach achttägiger Zucht beträgt er 0,64 %. Die Werte ändern sich kaum zwischen dem 8. und 21. Tage der Zucht, wenn man von den innerhalb der Fehlergrenze liegenden Schwankungen absieht. Nach dem 21. Tage beobachtet man, wie Abb. 1 deutlich zeigt, eine stetige Abnahme der Lipoidmengen bis auf etwa ein Drittel des anfänglich festgestellten Lipoidgehalts am 38. Tage. *Bac. prodigiosus* zeigt demnach ein völlig verschiedenes Verhalten im Vergleich zur *Hefe*, die bekanntlich unter ähnlichen Versuchsbedingungen mit steigendem Alter Verfettungserscheinungen aufweist.

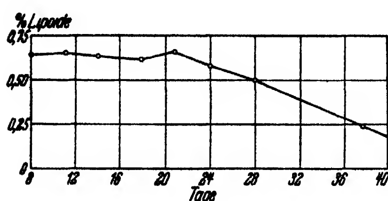


Abb. 1.
Einfluß der Zuchtdauer auf die Lipoidbildung.

II. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration. Den zu diesen Versuchen verwendeten Fleischagarböden erteilten wir durch Zugabe entsprechender Mengen Salzsäure bzw. Natronlauge wechselnd p_H-Werte von 6,0 bis 8,0. *Bac. prodigiosus* entwickelte sich im gewählten p_H-Bereich bei 20° recht gut; schon nach wenigen Tagen beobachtete man gleichmäßige Bakterienauflagerungen. Den Lipoidgehalt bestimmten wir nach 8, 18 und 28 Tagen, so daß neben der Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Lipoidbildung auch die Wechselwirkung zwischen Nährbodenreaktion und Zuchtdauer studiert werden konnte. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abb. 2 graphisch dargestellt. Übereinstimmend mit den obigen Ergebnissen findet man nach 8 Tagen bei $p_H = 7{,}2$ einen Lipoidwert von 0,6 %, der nach längerer Zeit wieder abnimmt. Das Maximum der Lipoidbildung erzielt man nach 8 Tagen (Abb. 2, Kurve I) bei $p_H = 6{,}6$ mit 1,23 %. Die Nährbodenreaktion ist demnach für die Lipoidbildung von Bedeutung, da die bloße Verschiebung vom neutralen ins schwach saure Gebiet eine Steigerung des Lipoidgehalts auf das Doppelte zur Folge hat. Wie der Verlauf der Kurve I (8 Tage) in Abb. 2 zeigt, sinkt

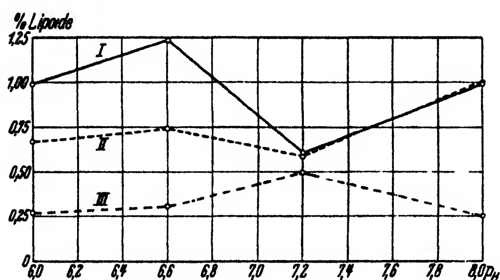


Abb. 2.
p_H-Abhängigkeit: I nach 8 Tagen, II nach 18 Tagen, III nach 28 Tagen.

die Lipoidmenge zu beiden Seiten des maximalen Wertes bei p_H 6,6 allmählich ab, d. h. sowohl eine Erhöhung wie eine Verminderung der Wasserstoffzahl bedingt eine Abnahme der Gesamtfettausbeute. Die niedrigsten Werte nach achttägiger Zucht erhält man bei $p_H = 7,2$, während eine weitere Verminderung der Wasserstoffionenkonzentration auf $p_H = 8,2$ wieder eine Steigerung des Lipoidgehalts mit sich bringt. Anders ist das Bild nach 18tägiger Zucht (Abb. 2, Kurve II). Es fällt sofort auf, daß die Lipoidmenge der auf sauren Nährböden ($p_H = 6,6$ und 6,0) gewachsenen Bakterien gesunken ist, wogegen sie bei annähernd neutraler ($p_H = 7,2$) und alkalischer Reaktion ($p_H = 8,0$) erhalten blieb.

Nach 28 Tagen sind die Werte durchwegs niedriger geworden (Abb. 2, Kurve III). Auffälligerweise liegt jetzt das Maximum bei annähernd neutraler Reaktion, welche früher Minimalwerte an Lipoiden ergab. Der Einfluß des Alters macht sich bei saurer und alkalischer Reaktion bedeutend stärker bemerkbar als bei neutraler, so daß die einmal gebildeten Lipoide in den ersteren Fällen stärker aufgebraucht werden als im letzteren und mithin nach 28 Tagen das Maximum bei $p_H = 7,2$ in Erscheinung tritt. Es besteht also tatsächlich eine Wechselwirkung zwischen Zuchtdauer und Nährbodenreaktion.

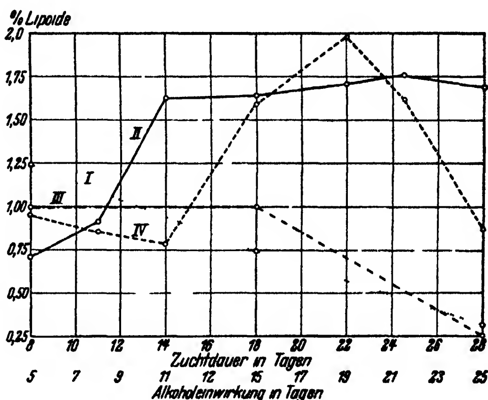


Abb. 3.
Lipoidbildung: I ohne, II mit Alkohol, $p_H = 6,6$; III ohne, IV mit Alkohol, $p_H = 8,0$.

III. Einfluß von Äthylalkohol. Nach Untersuchungen von *P. Lindner*[1] verfettet die *Hefe* bei Zufuhr von dampfförmigem Äthylalkohol sehr rasch, so daß die Zelle unter dem Mikroskop mit Fett erfüllt erscheint. Es war daher von Interesse, zu untersuchen, ob *Bac. prodigiosus* durch ähnliche Versuchsbedingungen ebenfalls zu stärkerer Lipoidbildung veranlaßt werden kann. Den Fleischagarnährböden erteilten wir die für die Lipoidbildung günstigen p_H-Werte 6,6 und 8,0. Da der Äthylalkohol ein Zellgift darstellt, züchteten wir zunächst 3 Tage bei 20°, bis sich gut sichtbare Bakterienauflagerungen zeigten, und unterwarfen die Kulturen erst dann der Einwirkung alkoholischer Dämpfe. Diese

[1] *P. Lindner*, Wochenschr. f. Brauerei **33**, 193, 1916; Zeitschr. f. techn. Biol. **7**, 68 u. 79, 1919; Zeitschr. f. angew. Chem. **35**, 110, 1922.

Behandlung setzten wir weitere 25 Tage fort und bestimmten fallweise den Gesamtfettgehalt. Über den Verlauf der Lipoidbildung mit und ohne Alkohol gibt das Schaubild (Abb. 3) Aufschluß. Ein Vergleich der zueinander gehörigen Kurven (Kurve I und II: $p_H = 6{,}6$; Kurve III und IV: $p_H = 8{,}0$) zeigt, daß anfänglich unter dem Einfluß des Alkohols eine Hemmung der Lipoidbildung eintritt; die in dieser Versuchsreihe nach achttägiger Zucht erhaltenen Werte liegen unter den bei normaler Zucht gefundenen. Besonders deutlich ist diese Hemmung bei $p_H = 6{,}6$. Nach längerer Alkoholeinwirkung hingegen steigen die Lipoidmengen an, und zwar nach 8 Tagen bei $p_H = 6{,}6$ und 11 Tagen bei $p_H = 8{,}0$, während die Lipoidmenge bei normaler Zucht gleich bleibt bzw. abnimmt. Das Maximum wird bei $p_H = 6{,}6$ nach 22, bei $p_H = 8{,}0$ nach 19 Tagen, gleichzeitig der absolute Höchstwert der Lipoidanreicherung durch Alkohol, erreicht. Von diesem Zeitpunkt an sinkt der Lipoidgehalt beim alkalischen Nährboden rasch ab, während er bei saurer Nährbodenreaktion auch nach 25 Tagen der Alkoholeinwirkung noch ziemlich konstant ist. Setzt man den Höchstwert an Gesamtfett bei normaler Zucht gleich 100 %, so ergibt sich unter dem Alkoholeinfluß eine absolute Steigerung von etwa 40 % bei $p_H = 6{,}6$ und 100 % bei $p_H = 8{,}0$.

Nach diesen Ergebnissen kann man auch bei *Bac. prodigiosus* durch Alkohol eine Lipoidanreicherung hervorrufen, die jedoch von der Dauer der Einwirkung und von der Nährbodenreaktion weitgehend abhängig ist. Sie ist gering im Vergleich zur Hefe, welche unter denselben Versuchsbedingungen[1] ein Vielfaches der normalen Lipoidmenge bildet.

IV. Vergleich der Lipoidbildung in festen und flüssigen Nährsubstraten. Für diese Versuchsreihe verwendeten wir Fleischbouillon und synthetische Nährlösungen. Diese bestanden aus der mineralischen Nährlösung mit 0,1 % Pepton (sicc. e carne *Merck*) als Stickstoff- und fallweise Glycerin, Dextrose oder Saccharose in m/20 Konzentration als besonderer Kohlenstoffquelle. Die eine Hälfte der Nährmedien wurde als Lösung verwendet, die andere durch Zusatz von 6 % Agar in feste Form übergeführt. Das Wachstum von *Bac. prodigiosus* war durchwegs sehr gut; schon am dritten Tage der Zucht bei 20° konnten wir deutlich sichtbare Trübungen bzw. Bakterienauflagerungen feststellen. Nach 12 Tagen bestimmten wir den Lipoidgehalt sämtlicher Kulturen. Die Ergebnisse sind in Tabelle I angeführt. Die prozentuellen Lipoidwerte zeigen, daß in *Nährlösungen* etwa zwei- bis viermal mehr Lipoide gebildet werden als auf festen Nährmedien. Dabei ist es belanglos, ob natürliche oder synthetische Nährböden Verwendung finden. Die Lipoidbildung ist aber stark von den gebotenen Nährstoffen abhängig. Den höchsten Lipoidgehalt weisen die Kulturen mit Glycerin

[1] *W. Halden, F. Bilger* u. *R. Kunze*, Naturwiss. 21, 660, 1933.

Tabelle I.

Nährsubstrat	Lipoidgehalt der Trockensubstanz in %	
	Nährlösung	Nährboden
Fleischbouillon	1,76	0,60
Mineralnährlösung		
C-Quelle m/20 Glycerin . . .	3,69	1,31
C-Quelle m/20 Dextrose . .	2,85	0,72
C-Quelle m/20 Saccharose . .	2,80	0,70

als Kohlenstoffquelle auf. In dieser Hinsicht weniger günstig sind Gaben von Dextrose oder Saccharose an Stelle von Glycerin.

In einer zweiten Mitteilung werden wir die Ergebnisse eingehender Untersuchungen bekanntgeben, welche bei Verwendung von Nährlösungen natürlicher und synthetischer Art erhalten worden sind.

Zusammenfassung.

Auf Grund unserer Versuche uber die Lipoidbildung eines farblos wachsenden Stammes von *Bac. prodigiosus* auf festen Nährsubstraten kommen wir zu folgenden Ergebnissen:

1. Nach achttägiger Zucht auf Fleischagar ($p_H = 7{,}0$) erhält man, auf das trockene Bakterienmaterial berechnet, einen durchschnittlichen Lipoidgehalt von 0,6 %. Mit zunehmendem Alter der Kultur nimmt er allmählich ab.

2. Das Maximum der Lipoidbildung wird bei schwach saurer Reaktion des Nährbodens ($p_H = 6{,}6$) nach achttägiger Zucht erreicht. Es beträgt 1,23 %.

3. Es besteht eine Wechselwirkung zwischen Nährbodenreaktion und Alter der Kultur insofern, als bei neutraler Reaktion die Lipoidmenge annähernd konstant bleibt, während sie bei alkalischer und saurer Reaktion mit höherem Alter stark absinkt.

4. Durch Einwirkung von Äthylalkohol kann eine Lipoidanreicherung erzielt werden. Am höchsten ist sie bei alkalischer Reaktion des Nährbodens nach 19tägiger Alkoholeinwirkung. Die Steigerung beträgt 100 % gegenüber normal gewachsenen Kulturen.

5. Ein Vergleich von festen und flüssigen Nährmedien gleicher Art ergab, daß die erhaltene Lipoidmenge in flüssigen Nährsubstraten zwei- bis viermal höher ist als auf festen.

6. Die Lipoidbildung ist vom Nährsubstrat weitgehend abhängig. Von den untersuchten Kohlenstoffquellen: Glycerin, Dextrose und Saccharose, in synthetischen Nährmedien fester und flüssiger Art, ergibt Glycerin die höchsten Lipoidgehalte.

(Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule Graz.)

Über die Bildung von Lipoiden durch Bakterien.

II. Mitteilung:

Die Gesamtfettbildung von Bac. prodigiosus in Nährlösungen.

Von

G. Gorbach und A. Sablatnög.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. März 1934.)

In der ersten Mitteilung[1] dieser Reihe haben wir den Lipoidstoffwechsel eines farblos wachsenden Stammes von *Bac. prodigiosus* untersucht und sind unter anderem zu dem Ergebnis gelangt, daß die in Nährlösungen gewachsenen Bakterien etwa zwei- bis viermal mehr Gesamtfett enthalten als die auf Agarnährböden gleicher Zusammensetzung gezüchteten. Anschließend an diese Untersuchungen werden nun die Ergebnisse einer Reihe von Versuchen mit flüssigen Nährmedien mitgeteilt. Es wurden dabei hauptsächlich synthetische, in ihrer Zusammensetzung also bekannte Nährlösungen verwendet, da man nur auf diese Weise einen tieferen Einblick in den Bildungsmechanismus der Lipoide gewinnen kann.

Hinsichtlich der Versuchstechnik sei auf unsere erste Mitteilung verwiesen. Es finden sich dort eingehende Angaben über die Zusammensetzung der Fleischbouillon und der mineralischen Nährlösung, die den synthetischen Nährmedien zugrunde liegt. Ergänzend ist nachzutragen, daß wir bei unseren Versuchen mit Nährlösungen auch die Vermehrungsgröße schätzten und in den Tabellen durch Kreuze symbolisierten. Die Zahl der Kreuze gibt die Vermehrungsgröße wieder; Zoogloeenbildung deuteten wir durch ein „*Z*“ an.

Einfluß der Zuchtdauer. Wir verwendeten Fleischbouillon und synthetische Nährlösungen. Diese bestanden aus der mineralischen Stammlösung mit 0,1 % Pepton (sicc. e carne *Merck*) und Glycerin bzw. Dextrose oder Saccharose in m/20 Konzentration als Kohlenstoffquelle. Die Reaktion der Nährsubstrate war $p_H = 7{,}0$. Nach 12- bzw. 34tägiger Zucht bei 20° zentrifugierten wir das Bakterienmaterial ab und bestimmten den Lipoidgehalt nach unserer Methode[2].

In Tabelle I sind die Versuchsergebnisse niedergelegt. Übereinstimmend mit den Ergebnissen unserer früheren Arbeit ist, auch in Nährlösungen, mit höherem Alter der Kultur eine Abnahme an Gesamt-

[1] *G. Gorbach* u. *A. Sablatnög*, diese Zeitschr. 5, 311, 1934. — [2] *G. Gorbach*, Mikrochem. 12, 162, 1932.

fett zu verzeichnen. Diese Abnahme war in allen untersuchten Nährlösungen festzustellen. Am stärksten machte sich der Einfluß der Zuchtdauer bei Glycerin (53 %), am wenigsten bei Dextrose (30 %) als Kohlenstoffquelle bemerkbar. Interessanterweise ist die Lipoidverminderung trotz der verschiedensten Lipoidwerte in flüssigen und festen Nährmedien prozentual gleich groß (siehe Tabelle I, Kol. 3).

Tabelle I.

Nährsubstrat	Lipoidgehalt der Trockensubstanz in %		Lipoidabnahme in %	
	Alter der Kulturen 12 Tage	Alter der Kulturen 34 Tage	Nährlösung	Nährboden
Fleischbouillon	1,76	0,96	45	47
Pepton-Glycerin	3,69	1,72	53	54
Pepton-Dextrose	2,85	1,99	30	28
Pepton-Saccharose	2,80	1,79	36	37

Bei den folgenden Versuchen wurden nur mehr synthetische Nährlösungen verwendet; die Zuchtdauer betrug in allen Fällen 12 Tage, die Zuchttemperatur, sofern nichts Anderes bemerkt ist, 20°.

Einfluß der Zuchttemperatur. Wir benutzten eine mineralische Pepton-Dextrose-Nährlösung (Pepton 0,1 %, Dextrose m/20, $p_H = 7{,}0$) und berücksichtigten Zuchttemperaturen von 6, 12, 20, 25 und 37°. Da *Bac. prodigiosus* bei 6 und 12° nur schlecht wächst, ließen wir die für diese Temperaturen bestimmten Kulturen zunächst 4 Tage bei 20° stehen, bis eine deutliche Trübung gute Vermehrung anzeigte, und stellten sie erst dann bei den bezeichneten Temperaturen auf.

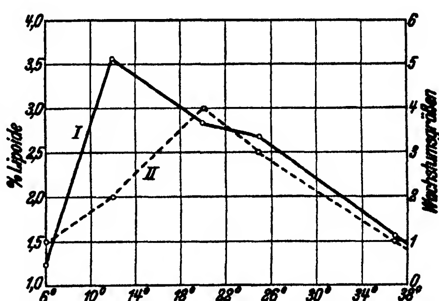


Abb. 1.
Temperaturabhängigkeit: I Lipoidmenge, II Wachstum.

Wie aus Kurve I in Abb. 1 hervorgeht, findet unter den gewählten Versuchsbedingungen maximale Lipoidbildung bei einer Zuchttemperatur von 12° statt. Dieses Maximum tritt scharf hervor; zu beiden Seiten fällt die Kurve sehr steil, fast senkrecht ab. Niedrigere Temperaturen haben eine rasche, höhere eine langsame Abnahme der Lipoidbildung zur Folge. Das Wachstumsoptimum liegt, wie die Wachstumskurve (II) in Abb. 1 zeigt, bei 20°. Wachstum und Lipoidbildung stehen in keinem direkten Zusammenhang. Sämtliche Kulturen wurden während der Zucht sauer, da die Dextrose kräftig angegriffen wurde. Über den

Einfluß dieser Säuerung auf den Lipoidstoffwechsel geben die End-p_H-Werte keinen Aufschluß. Die stärkste Säuerung wies die bei 20° gewachsene Kultur auf, bei der gleichzeitig das Wachstumsoptimum festgestellt werden konnte. Nach diesen Ergebnissen verhält sich *Bac. prodigiosus* wesentlich anders wie *Hefe*, die nach Untersuchungen von *H. Zickes*[1], auf Würzeagar gezüchtet, unter Temperaturen von 12 bis 15° in sehr geringem Maße und erst nach längerer Zeit Fett bildet, während sie bei solchen von 20 bis 30° binnen kurzem kräftige Verfettung zeigt.

Einfluß der Wasserstoffzahl. Diese Versuche führten wir mit mineralischen Pepton-Dextrose- und Pepton-Mannit-Lösungen aus (Pepton 0,1 %, Kohlenstoffquellen m/20). In Abb. 2, Kurve I, haben wir die Ergebnisse aus den Versuchen mit den Pepton-Dextrose-Nahrlösungen graphisch dargestellt. Die günstige Wirkung einer schwach sauren bis neutralen Anfangsreaktion auf den Lipoidstoffwechsel, den wir bei den Agarnahrböden feststellen konnten, bestatigt sich auch hier. Man erhält im p_H-Bereich von 5,5 bis 7,0 nur wenig differierende Lipoidausbeuten. Das Optimum liegt hier allerdings bei neutraler Reaktion ($p_H = 7{,}0$). Die Erhohung der Wasserstoffzahl uber diesen Wert hinaus bedingt eine unbedeutende, die Erniedrigung von $p_H = 7{,}5$ auf $p_H = 8{,}5$ eine starke, steil verlaufende Abnahme der Lipoidbildung. Wiederum fand wahrend der Zucht eine Sauerung der Kulturen statt. Das Wachstum war bei saurer bis neutraler Anfangsreaktion sehr gut, mit steigender Alkalität jedoch gehemmt (Abb. 2, Kurve II). Etwas anders sind die Ergebnisse bei Verwendung von Pepton-Mannit-Nährlosungen unter sonst gleichen Versuchsbedingungen (Abb. 2, Kurve III). Wir finden in diesem Falle ein scharfes Optimum bei $p_H = 6{,}2$. Zu beiden Seiten dieses Wertes fallt die Kurve steil ab. Im Gegensatz zum Dextroseversuch verursacht die Steigerung der Wasserstoffzahl über den Optimalwert hinaus eine raschere Abnahme des Gesamtfettgehalts als ihre Minderung. Die Vermehrung war sehr gut (Abb. 2, Kurve IV), am besten bei alkalischer Reaktion ($p_H = 8{,}4$). Sämtliche Kulturen wurden im Verlauf der Zucht sauer. Ein Vergleich der beiden

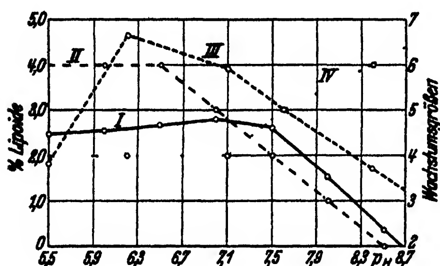


Abb. 2.
p_H-Abhängigkeit I Lipoidmenge, II Wachstum in Pepton-Dextroselösung, III Lipoidmenge, IV Wachstum in Pepton-Mannitlösung

[1] *H. Zickes*, Centralbl. f. Bakt. II, 49, 368, 1919.

Lipoidkurven in Abb. 2 ergibt, daß in Nährlösungen mit Mannit (Kurve III) bedeutend höhere Lipoidwerte erzielt werden als in solchen mit Dextrose (Kurve I). Die Optima liegen um 70 % auseinander. Der Lipoidstoffwechsel ist, wie auch unsere früheren Untersuchungen ergeben haben, von der Art der gebotenen Kohlenstoffquelle stark abhängig.

Die Lipoidbildung in ihrer Abhängigkeit vom Nährsubstrat.

I. Versuchsreihe mit verschiedenen Kohlenstoffquellen. Als konstante Stickstoffquelle wurde in allen Fallen Pepton (sicc. e carne *Merck*) in einer Konzentration von 0,1 % verwendet. Da dieses gleichzeitig als C-Quelle verwertet werden kann, haben wir zunächst die Lipoidbildung in einer mineralischen Nährlösung mit einem Zusatz von Pepton allein untersucht und den aufgefundenen Lipoidgehalt bei der Auswertung unserer Versuche berücksichtigt. In Tabelle II sind die Ergebnisse mit einigen C-Quellen in m/20 Konzentration angegeben.

Tabelle II.

N-Quelle 0,1 %	C-Quelle m/20	Anfangs-p_H	End-p_H	Wachstumsgroßen	% Lipoide in der Trockensubstanz
Pepton	Mannit	7,1	5,5	××××	3,93
	Glycerin	7,1	5,5	××××	3,69
	Saccharose	7,1	4,5	××××	2,86
	Dextrose	7,1	5,1	×××××	2,82
	Stärke	7,1	6,0	×××××	1,55
	Maltose	7,1	4,7	××××	1,50
	—	7,1	7,1	×××	1,20

Maximale Lipoidbildung erhält man mit Mannit. Ihm nahe kommt in dieser Hinsicht Glycerin, was mit den Ergebnissen unserer Versuche auf festen Nährböden übereinstimmt, die ebenfalls beste Lipoidbildung bei Verwendung dieser beiden Alkohole als C-Quellen ergaben. Dextrose und der bei der hydrolytischen Spaltung Dextrose liefernde Rohrzucker zeigen nur mittlere Werte. Die Stärke, welche bei der Hydrolyse Maltose und schließlich Dextrose gibt, verhält sich bezüglich ihrer lipoidbildenden Wirkung ähnlich ihrem Spaltungsprodukt Maltose. Die geringste Gesamtfettausbeute brachte der Versuch mit Pepton allein. Sämtliche C-Quellen haben also die Lipoidbildung gefördert und wurden, wie die End-p_H-Werte zeigen, während der Zucht angegriffen. Das Wachstum war überall sehr gut, am besten in Dextrose- und Stärkenährlösungen.

Weitere C-Quellen haben wir in einem Parallelversuch untersucht, bei dem wir jedoch die Konzentration m/50 wählten. Diese Änderung der Konzentration allein hatte eine völlige Verschiebung der C-Quellen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Lipoidbildung zur Folge (Tabelle III). Die Lipoidwerte sind außerdem durchschnittlich gesunken.

Den höchsten Gesamtfettgehalt zeigen nun Nährlösungen mit Maltose, einen nur wenig niedrigeren solche mit Dextrose; an dritter Stelle folgt Mannit und erst an sechster Glycerin, die beide im früheren Versuch die höchsten Werte brachten. Ein Vergleich der Tabellen II und III

Tabelle III.

N-Quelle 0,1%	C-Quelle m/50	Anfangs-p_H	End-p_H	Wachstums-größen	% Lipoide in der Trockensubstanz
Pepton	Maltose	7,1	5,9	×	2,19
	Dextrose	7,1	6,5	××××	2,12
	Mannit	7,1	6,4	×××××	2,04
	Saccharose	7,1	5,6	××	1,91
	Brenztraubensaure	7,1	7,3	×××××Z	1,82
	Glycerin	7,1	6,7	×××××	1,59
	Lavulose	7,1	6,7	×××	1,20
	Isodulcit	7,1	7,0	××	0,96
	Lactose	7,1	6,9	×××	0,93
	Galactose	7,1	6,9	××××	0,79
	Starke	7,1	7,0	××××	0,54
	—	7,1	7,1	×××	1,20

gibt die Erklärung für diese Verschiebung: Durch die Konzentrationsänderung stieg nämlich der Lipoidgehalt der Maltosekulturen von 1,50 auf 2,19%, während er beispielsweise bei Mannit von 3,93 auf 2,04% fiel. Auch bei der Dextrose bewirkte die Konzentrationsverschiebung von m/20 auf m/50 ein Absinken der Lipoidmenge, und zwar von 2,82 auf 2,12%. Es gibt daher für jede C-Quelle ein *Konzentrationsoptimum*, das nicht wesentlich über- oder unterschritten werden darf. Für Maltosenährlösungen liegt es zwischen 0 und m/20, für Mannitlösungen dagegen, wie später gezeigt werden soll, bei m/20, so daß eine Verminderung der Konzentration von m/20 auf m/50 zu einer Lipoidabnahme führen muß.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen liefert die Brenztraubensäure, die bekanntlich beim fermentativen Abbau der Dextrose[1] als Zwischenprodukt entsteht, sehr gute Lipoidwerte (1,82%). Nahe steht ihr hierin die Saccharose. Interessanterweise nimmt die Fructose, welche bei der Rohrzuckerinversion gleichzeitig mit der Dextrose entsteht, keinen Einfluß auf die Lipoidbildung, da der erhaltene Wert dem der reinen Peptonlösung gleichkommt. Unterboten wird dieser bei Isodulcit, Lactose und Stärke als Kohlenstoffquellen; diese hemmen also in der gewählten Konzentration bereits die Lipoidbildung. Wie wenig sich Wachstum und Lipoidstoffwechsel beeinflussen, zeigen die Vermehrungsgrößen in Tabelle III. Trotz besten Wachstums werden

[1] *C. Neuberg* u. *I. Kerb*, Biochem. Zeitschr. 53, 406, 1913.

in Galactose- und Stärkelösungen nur niedere Lipoidwerte erzielt, während in den Maltoselösungen, die maximale Lipoidausbeuten brachten, äußerst langsames Wachstum zu beobachten war. Die End-p_H-Werte lassen abermals eine mehr oder minder starke Säuerung der Kulturen erkennen; eine Ausnahme macht die Brenztraubensäurelösung, welche alkalisch geworden ist.

Anschließend haben wir den Einfluß der Konzentration von Dextrose, Mannit und Brenztraubensäure auf den Gesamtfettstoffwechsel näher untersucht. Wir steigerten die Konzentration von Null (mineralische Nährlösung + 0,1 % Pepton) bis 0,5 mol. (p_H = 7,0). Kurve I in Abb. 3 gibt die Abhängigkeit der Gesamtfettausbeuten von der Dextrosekonzentration wieder. Bei einer Konzentration von m/20 erscheint ein scharf ausgeprägtes Maximum. Eine Änderung der Konzentration auf m/50 bzw. m/10 setzt die Lipoidbildung stark herab. In Konzentrationen von m/5 bis m/2 hemmt die Dextrose bereits die Lipoidbildung, da der Wert der reinen Peptonlösung (Nullwert) nicht mehr erreicht wird. Das Wachstum war im untersuchten Konzentrationsbereich sehr gut, am besten bei Konzentrationen von m/10 bis m/20. Sämtliche Kulturen erfuhren während der Zucht eine Säuerung, die von der Dextrosekonzentration direkt abhängig war. Mit erhöhter Dextrosekonzentration verschoben sich die p_H-Werte immer mehr ins Gebiet der höheren Wasserstoffionenkonzentrationen. Die beobachtete Hemmung der Lipoidbildung mag in dieser starken p_H-Wert-Verschiebung begründet sein. Hochkonzentrierte Dextrosekulturen werden frühzeitig stark sauer, so daß die optimalen Bedingungen für die Bildung lipoider Stoffe nicht mehr gegeben sind. Im Gegensatz zur Lipoidbildung wird das Wachstum durch hohe Dextrosegaben nicht wesentlich gehemmt. Wiederum kann ein Zusammenhang zwischen beiden nicht ersehen werden.

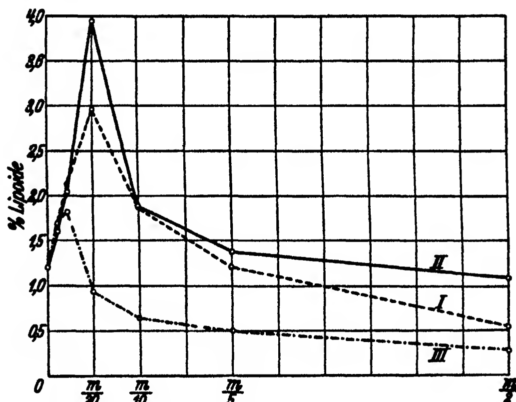


Abb. 3.
Abhängigkeit von der Konzentration: I Dextrose, II Mannit, III Brenztraubensäure.

Die Ergebnisse eines Versuchs mit Mannit unter sonst gleichen Bedingungen sind in Kurve II der Abb. 3 graphisch dargestellt. Mannit verhält sich ähnlich wie Dextrose. Den Lipoidhöchstwert erreicht man

ebenfalls bei einer Konzentration von m/20; größere oder kleinere Mannitzusätze bewirken eine rasche Abnahme der Lipoidmengen. Bewerkenswert ist die Beobachtung, daß durch hohe Mannitgaben keine Hemmung der Lipoidbildung eintritt, da der Wert der Peptonlösung (Nullwert) kaum unterboten wird. Wie die End-p_H-Werte zeigten, findet bei höheren Mannitkonzentrationen keine so starke Säuerung der Kulturen statt wie bei der Dextrose. Damit fällt nach der oben gegebenen Erklärung die Ursache für die Hemmung weg. Die kräftigste Vermehrung wiesen m/100 Mannitlösungen auf, aber auch in den übrigen Fällen war das Wachstum gut.

Kurve III in Abb. 3 bringt die Ergebnisse mit Brenztraubensäure. Der durch die Carboxylase aus ihr gebildete Acetaldehyd soll nach den Arbeiten von *C. Neuberg* und *B. Arinstein*[1] sowie nach *H. Haehn* und Mitarbeitern[2] ein wichtiges Glied der Kette vom Umbau der Glucose in Fettsäure darstellen. Wir konnten bereits zeigen, daß die Brenztraubensäure die Lipoidbildung günstig beeinflußt (Tabelle III). Die Kurve zeigt, daß auch in diesem Falle ein scharf ausgepragtes Optimum auftritt, hier jedoch bei niedrigerer Konzentration (m/50) als in den beiden Parallelversuchen. Höhere und niedrigere Konzentrationen führen zu einer Abnahme der Lipoidmengen. Schon von einer m/20 Konzentration aufwarts fallen sie unter jene der reinen Peptonlösung. Auch hier mag die Ursache in der Reaktion des Nährbodens liegen, die sich während der Zucht in das fur die Lipoidbildung ebenfalls ungünstige alkalische Gebiet verschob. Das Wachstum war durchwegs gut, am besten bei Konzentrationen von m/100 bis m/20.

II. Versuchreihe mit verschiedenen Stickstoffquellen. Bei unseren bisherigen Versuchen haben wir Pepton als Stickstoffquelle verwendet. Die folgenden Versuche zeigen den Einfluß verschiedener N-Quellen auf die Bildung lipoider Stoffe, wobei Dextrose stets als Kohlenstoffquelle diente. Bei bekanntem Molekulargewicht wählten wir m/20, bei Casein (*Hammarsten*) und Pepton (sicc. e carne) 0,75 %ige Konzentration der N-Quellen. Wie Tabelle IV zeigt, erhält man schon mit Ammonchlorid als N-Quelle gute Lipoidwerte, die die mit reinen Peptonnährlösungen ohne Dextrose (Tabelle II) erzielten übersteigen. Das Wachstum ist sehr gut. Von den organischen Ammonsalzen liefert das milchsaure Ammon mit 8,1 % den höchsten Wert, den wir im Rahmen unserer Untersuchungen beobachten konnten. Dem Ammonlactat am nächsten steht das apfelsaure Ammon mit einer

---

[1] *C. Neuberg* u. *B. Arinstein*, Biochem. Zeitschr. **117**, 269, 1923. — [2] *H. Haehn*, Chem. Ztg. **44**, 9, 18, 1920; *H. Haehn* u. *W. Kinttof*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **56**, 439, 1923.

Lipoidausbeute von 6,29 %. Weit niedriger ist sie bei Ammoncitrat (1,99 %). Im Gegensatz zu den anderen organischen Ammonsalzen wurde die Kultur in diesem Falle während der Zucht alkalisch; möglicherweise erklärt sich hieraus der Lipoidausfall.

Tabelle IV.

Stickstoffquellen m/20 bzw. 0,75 %	Anfangs-p_H	End-p_H	Wachstumsgrößen	% Lipoide in der Trockensubstanz
Ammonchlorid	7,0	5,1	××××	1,37
milchsaures Ammon . . .	7,0	5,1	××××	8.10
apfelsaures Ammon . . .	7,0	6,7	×××××	6,20
citronensaures Ammon . .	7,0	7,5	××××××	1,99
Alanin	7,0	5,1	××××	1,99
Asparagin	7,0	5,5	×××××	3,62
asparaginsaures Na . .	7,0	6,3	××××××	1,19
Harnstoff	7,0	5,5	××	1,65
Casein	7,0	4,7	××××	2,61
Pepton	7.0	5.0	××××	3.65

Unter den Aminosäuren ergibt Asparagin mit 3,62 % die höchsten Werte. Bedeutend geringer ist die Gesamtfettbildung bei asparaginsaurem Natrium. Mit Harnstoff erzielt man trotz mäßigen Wachstums gleichfalls gute Lipoidausbeuten. Die hochwertigen N-Quellen Casein und Pepton geben nur mittlere Werte, die schon mit Asparagin zu erreichen sind. Eine Abhängigkeit der Lipoidbildung vom Wachstum kann in keinem Falle ersehen werden.

Die Ergebnisse einer Konzentrationsreihe mit Asparagin führen wir in Tabelle V an. Als Kohlenstoffquelle verwendeten wir Dextrose

Tabelle V.

Asparaginkonzentration	Anfangs-p_H	End-p_H	Wachstumsgrößen	% Lipoide in der Trockensubstanz
m/100	7,0	5,8	××××××*Z*	3,46
m/50	7,0	5,7	××××××*Z*	3,46
m/20	7,0	5.5	×××××	3,63
m/10	7,0	5,8	××××	4,26

in m/20 Konzentration. Das Asparagin setzten wir in Konzentrationen von m/100 bis m/10 der Nährlösung zu. Die Erhöhung der Asparaginkonzentration von m/100 auf m/50 brachte keine Steigerung der Lipoidausbeute. Erst die Erhöhung des Asparaginzusatzes auf m/20 bedingte eine geringe, jene auf m/10 eine deutliche Lipoidzunahme. Im Gegensatz zu den entsprechenden Zuchtversuchen mit Kohlenstoffquellen stieg hier die Lipoidausbeute mit der Konzentration allmählich an. Die beste Vermehrung wiesen Nährlösungen niederer Asparaginkonzentration

(m/100 und m/50) auf; mit steigender Asparaginkonzentration wurde sie etwas gehemmt. Bei Abbruch des Versuchs waren sämtliche Kulturen sauer. Zu grundsätzlich gleichen Ergebnissen führten die Konzentrationsversuche mit Pepton (Tabelle VI), denn Peptonzusätze von 0,1 bis

Tabelle VI.

Peptonkonzentration in %	Anfangs-p_H	End-p_H	Wachstumsgrößen	% Lipoide in der Trockensubstanz
0,10	7,0	5,1	×××××	2,83
0,25	7,0	4,7	×××××	3,06
0,50	7,0	4,9	××××	3,43
0,75	7,0	5,0	××××	3,64
1,00	7,0	5,1	××××	4,87

0,75 % brachten ebenfalls eine allmähliche Zunahme des Lipoidgehalts. Auffällig war hier der rasche Anstieg bei Erhöhung der Peptonkonzentration von 0,75 auf 1 %. Das beste Wachstum zeigten wiederum die Kulturen mit geringen Peptonzusätzen.

Bestimmung des unverseifbaren Anteils im Lipoidextrakt. Zur Bestimmung des unverseifbaren Anteils sammelten wir die Lipoidextrakte sämtlicher Versuche und bewahrten sie in benzolischer Losung auf. Nach dem Verdunsten des Toluols blieb eine schwach gelb gefärbte Masse von vaselinartiger Konsistenz zurück, welche bei 30° flüssig war. Im kurzwelligen Licht zeigte die Lösung in Benzol eine schöne hellblaue Fluoreszenz. Zur Bestimmung des Unverseifbaren benutzten wir eine von uns ausgearbeitete Mikromethode[1], die bereits mit 2 bis 3 mg der Substanz hinreichend genaue Resultate liefert. Wir erhielten aus drei Parallelbestimmungen im Mittel einen Gehalt von 12,8 %.

Zusammenfassung.

Die Untersuchungen über die Lipoidbildung bei *Bac. prodigiosus* in synthetischen Nährlösungen haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. In flüssigen Nährmedien nimmt die Lipoidbildung übereinstimmend mit den Ergebnissen auf festen Nährsubstraten mit dem Alter der Kultur ab. Die prozentuale Abnahme ist in beiden Fällen gleich groß.

2. Das Temperaturoptimum der Lipoidbildung liegt bei 12°.

3. Für die Lipoidbildung ist eine schwach saure bis neutrale Anfangsreaktion der Nährlösung günstig. Die Lage des optimalen p_H-Wertes ist von der Zusammensetzung der Nährlösung abhängig.

4. Die Versuche mit verschiedenen Kohlenstoffquellen haben den günstigen Einfluß mehrwertiger Alkohole wie Mannit und Glycerin

[1] *G. Gorbach* u. *A. Sablatnög*, Mikrochem. 14, 256, 1933/34.

auf die Lipoidbildung ergeben. Dextrose und die bei der enzymatischen Spaltung Dextrose liefernden Disaccharide Saccharose und Maltose zeigen ebenfalls gute Lipoidbildung. Dasselbe gilt für die Brenztraubensäure, die beim Abbau der Dextrose als Zwischenprodukt entsteht.

5. Die Lipoidbildung ist von der Konzentration der Kohlenstoffquelle weitgehend abhängig. Es gibt für jede Kohlenstoffquelle ein Konzentrationsoptimum, das im allgemeinen bei niederen Konzentrationen liegt.

6. Versuche mit einer Reihe von Stickstoffquellen brachten das Ergebnis, daß die Ammonsalze organischer Säuren die Lipoidbildung besonders fördern. Die höchsten Lipoidwerte erhält man bei Versuchen mit milchsaurem Ammon (8,1 %) und apfelsaurem Ammon (6,2 %), während die hochwertigen Stickstoffquellen Casein und Pepton nur mittlere Lipoidwerte ergeben.

7. Mit steigender Konzentration der Stickstoffquelle erhöht sich auch der Lipoidgehalt der Bakterienzelle.

8. Ein gesetzmäßiger Zusammenhang zwischen Wachstum und Lipoidbildung bei *Bac. prodigiosus* kann nicht festgestellt werden.

9. Die Bestimmung des unverseifbaren Anteils im Lipoidextrakt ergab einen durchschnittlichen Gehalt von 12,8 %.

(Laboratorio di Batteriologia del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa.)

Studio microbiologico di un terreno torboso.

per

Onorato Verona.

(Eingegangen am 9. März 1934.)

Nei comprensori di bonifica delle zone di bassopiano e litoranee, specialmente nella bassa Valle Padana e lungo il versante tirrenico, s'incontrano terreni occupanti vaste superfici, bonificate o in corso di trasformazione, il cui riscatto e conseguente messa a coltura si offrono complessi ed anche lenti per i vizi di genesi che presentano.

Troviamo tra questi suoli, in primo piano, i terreni torbosi o cuorosi, bene spesso viziati da inquinamenti salini, dovuti al lento secolare accumulo dei residui vegetali della flora palustre e alofila. L'eccesso di tali materiali organici ostacola ed anche impedisce in un primo tempo le lavorazioni del terreno mentre in seguito si costipano notevolmente, originando zone depresse.

Prerogativa di questi terreni è quella di trattenere un' elevata percentuale di acqua che tuttavia cedono difficilmente; una volta poi asciutti si imbevono con altrettanta difficoltà richiedendo all'uopo considerevoli masse liquide. Onde è che, a bonifica idraulica avvenuta, i terreni delle zone torbose si presentano ancora notevolmente anomali al punto da ostacolare, per un lungo volger di anni, ogni rapida e proficua opera di trasformazione agraria.

L'indagine chimica di questi terreni ha messo in evidenza come, accanto all'eccesso di sostanza organica, debba porsi un alto esponente acidimetrico sia esso dovuto ad acidità organica che, come sembra, anche minerale originantesi questa, in prevalenza, dai processi di ossidazione dello zolfo sia esso rinvenibile, nei suoli in parola, sotto forma di composti piritosi, sia che si liberi durante i processi di mineralizzazione della sostanza organica. Tutto ciò, d'altra parte, non rappresenta che un aspetto del quadro clinico dei suoli torbosi poichè, a rendere completa la diagnosi, manca, aggravante, l'elencazione dei vizi di natura microbiologica.

Come le attività microbiche si svolgano in questi suoli, assai difficile è di poter precisare dal momento che mancano, in Italia, ricerche del genere condotte almeno per un certo volger di tempo e in tutte le condizioni, assai varie, quanto è varia la gamma dello stato anomalo dei suoli in parola. Da noi, alcune ricerche microbiologiche sui terreni torbosi si trovano riferite,

incidentalmente, da *Antoniani, Arnaudi e Nicolini,* mentre lo stesso *Arnaudi,* poco prima, saggiava il poterre azotofissatore dei terreni di risiera. All'estero *de Rossi* cita le ricerche di *Ritter, Remy, Christensen, Arnd,* secondo i quali risulta assai scarso il numero dei microbi, specialmente nei terreni di torbiera alta non coltivata, prevalendo gli eumiceti e mancando nitrificanti e azotobatteri. Più antiche ricerche di *Fabricius* e *Feilitzen* tendono a dimostrare la favorevole influenza della coltura e dell' aggiunta di calce avendo trovato, per 1 g di terra, i seguenti numeri di germi dedotti da una serie di analisi periodiche:

torba non drenata	138.500
torba drenata non coltivata.	200.300
t. coltivata da poco e trattata con 3500 kg ad ha. di CaO	6.900.400
t. coltivata da 10 anni e trattata con calce e letame . .	6.224.500

L'aggiunta di calce, però, non da tutti è consigliata dal punto di vista batteriologico e nonostante i suoi evidenti risultati colturali.

Densch pensa che la calce provochi liberazione di azoto e che tale liberazione sia accompagnata da produzione di nitriti e di altri composti azotati forse dannosi alle piante. *Gully* nota che una parte soltanto di ammoniaca subirebbe l'ossidazione a nitrito e sarebbe seguita da denitrificazione. *Arnd,* invece, ritiene che nei terreni di alta torbiera, acidi e poveri di calce, l'aggiunta di sostanze basiche combinata con una buona aereazione determini la comparsa di un attivo processo di nitrificazione. *Christensen,* che particolarmente ha saggiato — con esito negativo, a meno che non vengano eseguite aggiunte di calcare e fosfati — il potere decomponente della cellulosa, osserva che la deficiente funzionalità microbica dei terreni di alta torbiera dipende dal loro stato chimico come dalla scarsezza del numero dei germi.

Fischer occupandosi in modo speciale del potere di azotofissazione trova che, rispetto a questo, esercitano azione ostacolante le sostanze umiche a reazione acida che si possono estrarre con acqua. *Bedford* segue l'evoluzione dell'anidride carbonica e trova che essa varia con il variare del numero dei batteri. Dice che fosforo e potassio sono i fattori limitanti dello sviluppo delle piante e che la presenza di funghi ne è una caratteristica. *Belikova,* usando il saggio di *Christensen,* trova abbastanza veloce la decomposizione della cellulosa; decomposizione che non avviene anaerobicamente. *Makrinow,* infine, ricorda in materia i lavori di *Bedak, Waksman* e *Stevens, Logwinowa,* e riferisce le ricerche condotte su torba lavorata in confronto di torba non lavorata.

Non sono molti, quindi, i reperti che si hanno sullo stato microbiologico dei terreni torbosi. Per cui si è ritenuto quanto mai opportuno — interessati in questo dal R. Laboratorio Crittogamico di Pavia — di procedere all'esame microbiologico di un terreno torboso del Ferrarese nel quale, da poco tempo, si tenta la coltivazione del riso.

L'aspetto di questo terreno ripete, tipicamente, i caratteri dei suoli torbosi. Nel momento in cui furono eseguite le analisi microbiologiche aveva un contenuto in acqua pari al 59.08 %; la sostanza organica assommava al 36.06 % il che equivale all' 88.12 % di materia

secca; l'acidità, non eccessiva, uguale a p_H 5.9; non erano presenti carbonati, assenti i cloruri che talvolta si rinvengono in questi terreni.

I. Esame quantitativo. Metodo: fu fatto uso del metodo indiretto della conta delle colonie sviluppantisi su piastre allestite con agar-fagiuoli al 10° giorno di coltura a 24° C. L'esame si estese, oltre che alla terra, al velo liquido sovrastante.

Risultati: questi, riferiti al grammo di terra secca e ad 1 ccm di liquido, sono riportati nelle tab. I e II. Essi danno indice della debole carica batterica unita ad una forte percentuale di funghi. Il numero complessivo, assai basso, dei germi quasi si corrisponde sia nel terreno che nel liquido sovrastante, variando solo la percentuale dei grandi gruppi di microbi. I funghi, infatti, rappresentano, nel terreno, il 43 % della totale popolazione microbica mentre nel liquido discendono al 26 circa %. Pressochè identico rimane il rapporto numerico degli Attinomiceti. In linea di massima tali risultati confermano quelli ottenuti dai precedenti sperimentatori: scarsezza di germi, in prevalenza rappresentati da Funghi.

Tabella I.

(materiale d'innesto, per ogni piastra, 0.1 ccm di 1 g di terra in 1000 di acqua)

No delle piastre	Colonie sviluppatesi su piastre				Germi per 1 g di terra			
	Batteri	Attinomiceti	Funghi	Totale	Batteri	Attinomiceti	Funghi	Totale
1	9	3	11	23	90 000	30 000	110 000	230 000
2	10	2	7	19	100 000	20 000	70 000	190 000
3	13	4	11	28	130 000	40 000	110 000	280 000
4	10	5	7	22	100 000	50 000	70 000	220 000
5	10	2	16	28	100 000	20 000	160 000	280 000
6	12	5	8	25	120 000	50 000	80 000	250 000
7	9	5	15	29	90 000	50 000	150 000	290 000
8	9	4	11	24	90 000	40 000	110 000	240 000
9	8	6	10	24	80 000	60 000	100 000	240 000
10	10	5	12	27	100 000	50 000	120 000	270 000
11	12	5	9	26	120 000	50 000	90 000	260 000
12	11	3	12	26	110 000	30 000	120 000	260 000
13	9	6	13	28	90 000	60 000	130 000	280 000
14	10	3	11	24	100 000	30 000	110 000	240 000
15	10	4	10	24	100 000	40 000	100 000	240 000
16	8	4	9	21	80 000	40 000	90 000	210 000
17	11	3	12	26	110 000	30 000	120 000	260 000
18	9	6	13	28	90 000	60 000	130 000	280 000
19	10	2	11	23	100 000	20 000	110 000	230 000
20	11	5	9	25	110 000	50 000	90 000	250 000
		Totali		500	2.010 000	820 000	2 170 000	5 000 000
		medie		25	105.000	40.100	108 500	258.600
					41.24 %	15.75 %	43.01 %	

media = 25.86, errore probabile ± 0 37, deviazione media, $\sigma = 2\ 68 \pm 0.28$, coeff di variabilità, C. V. = 10.56 ± 1.18 %, errore medio della media, $\Delta = \pm 0\ 55$, errore medio, $E_m = 0.94$ %.

Tabella II.
(materiale d'innesto, per ogni piastra, 0.1 ccm di 1 ccm di liquido in 1000 di acqua)

N° delle piastre	Colonie sviluppatesi sulle piastre				Germi per 1 ccm di liquido			
	Batteri	Attinomiceti	Funghi	Totale	Batteri	Attinomiceti	Funghi	Totale
1	18	5	7	30	180 000	50 000	70 000	300 000
2	12	8	6	26	120 000	80 000	60 000	260 000
3	14	6	7	27	140 000	60 000	70 000	270 000
4	12	4	5	21	120 000	40 000	50 000	210 000
5	18	3	10	31	180 000	30 000	100 000	310 000
6	17	4	9	30	170 000	40 000	90 000	300 000
7	12	4	6	22	120 000	40 000	60 000	220 000
8	15	5	5	25	150 000	50 000	50 000	250 000
9	14	5	7	26	140 000	50 000	70 000	260 000
10	16	7	6	29	160 000	70 000	60 000	290 000
11	15	9	8	26	150 000	90 000	80 000	260 000
12	12	5	5	22	120 000	50 000	50 000	220 000
13	18	5	9	32	180 000	50 000	90 000	320 000
14	17	6	7	30	170 000	60 000	70 000	300 000
15	13	4	7	24	130 000	40 000	70 000	240 000
16	15	3	6	24	150 000	30 000	60 000	240 000
17	15	6	8	29	150 000	60 000	80 000	290 000
18	14	6	6	26	140 000	60 000	60 000	260 000
19	16	5	7	28	160 000	50 000	70 000	280 000
20	15	5	7	27	150 000	50 000	70 000	270 000
		Totali .	.	535	2 980 000	990 000	1 380 000	5 350 000
		medie .		26.75	149 000	49 500	69 000	**267.750**

media = 26.75, errore probabile + 0 49, deviazione media, $\sigma = 3\ 27 \pm 0\ 34$, coeff. di variabilità, C. V. = 12.59 ± 1.34 %, errore medio della media, $\Delta = \pm 0\ 73$, errore medio, $E_m = 1\ 84$ %

II. Esame qualitativo Con riferimento a quanto sopra si è detto circa la presenza degli Attinomiceti e dei Funghi in rapporto ai Batteri, aggiungiamo qui l'elenco delle prevalenti forme sviluppatesi sulle piastre non senza avvertire che esso deve essere integrato dalle altre forme funzionalmente specifiche e di cui sarà dato cenno in seguito, quali i cellulositici, gli azotofissatori, i denitrificanti e riduttori di solfati:

Bact. fluorescens liquefaciens (Fl) L. et N.; *Bact. punctatum (Zimm.) L. et N.*; *Bact. helvolum (Zimm.) L. et N.*; *Bac. subtilis Cohn*; *Bac. mycoides Fl.*; *Bac. ruminatus Meyer et Gottheil*; *Act albus (W. C.) K.*; *Act. griseus (W. C.) K.*; *Act. roseus (W. C.) K.*; *Aspergillus glaucus (L.) Link.*; *Asp. flavus Link*; *Penicillium crustaceum (L.) Fr* ; *Pen. luteum Zukal*; *Pen. sp.*; *Fusarium roseum Link.*; *Fus. sp.*; *Verticillium sp.*; *Sclerotium sp.*; *Trichoderma sp.*; *Mucor sp.*

Ciò dimostra una flora batterica piuttosto uniforme rappresentata da forme banali ovunque rinvenibili. Un pò più varia è la flora fungina con prevalenza di mucedinacee ialosporee.

III. Misura del potere di ammonizzazione. Metodo: 10 ccm di peptone all' 1.5% furono inoculati, in quadruplo, con 5 ccm dello stemperamento acquoso di terra nel rapporto 1 : 5; fu coltivato per quattro giorni a 24° C. Al termine del quarto giorno fu distillato in presenza di magnesia. La stessa prova fu eseguita inoculando 5 ccm di 50 ccm di liquido sovrastante il terreno in 250 ccm di acqua. Ed inoltre, con le stesse modalità, una buona terra di giardino venne anche inoculata nella soluzione di peptone fatta, anzichè in acqua, nel liquido sovrastante il suolo torboso.

Risultati: sono riferiti a 1000 di soluzione impiegata ed in ogni caso è stata detratta la quantità di ammoniaca presente nel materiale d' innesto e a parte determinata:

	NH_3 g per l *	
	trovata	al netto di quella presente nel materiale di innesto
Terreno di torbiera	0.86 853	0.84 300
Liquido sovrastante lo strato torboso	0.86 877	0.85 137
Terreno di giardino	0 91 580	0.91 572
Id. in presenza del liquido sovrastante lo strato torboso	0.77 392	0.55 054

* Media di quattro determinazioni.

Tali risultati dimostrano che i processi putrefattivi non si svolgono con quell'intensità pari alla quantità di materiali putrefattivi esistenti, e vengono ostacolati dalla presenza di sostanze tossiche presenti nelle acque di circolazione.

IV. Misura del potere di nitrificazione. Metodo: In piccole *Erlenmeyer* contenenti 50 ccm di soluzione di *Omelianski* fu innestato 1 g di terreno e furono determinati i nitrati dopo 25 giorni di coltura a 24° C.

Risultati. Come per la misura del potere ammonizzante eseguimmo la prova non solo del terreno torboso ma anche di un terreno normale in presenza o meno del liquido costituente il velo sopra la torba. I risultati sono riferiti al litro di soluzione nitrificabile:

	HNO_3 g per l.*
Terreno di torbiera	0 0750
Terreno di giardino	0.7367
Id. in presenza del liquido sovrastante lo strato torboso . . .	tr.

* Media di tre determinazioni.

L'esperienza dimostra nel terreno torboso un assai scarso potere nitrificante anche quando venga messo nelle condizioni più opportune allo svolgimento del processo: in queste condizioni esso si addimostra essere $^1/_{10}$ circa di quello di un terreno ritenuto normale. Il fatto deve collegarsi alla scarsezza numerica delle forme nitrificanti, accertata a

mezzo di colture allestite con il noto metodo di *Winogradsky*, e alla loro debole funzionalità. Tale funzionalità, poi, viene completamente frustrata della presenza delle sostanze presenti nel liquido del terreno.

Praticamente, quindi, il processo di nitrificazione è nullo nonostante la presenza, sia pure scarsa, dei germi specifici.

V. Misura del potere di denitrificazione. Metodo: In *Erlenmeyer* contenenti 50 ccm di liquido di *Giltay* vennero innestati 10 ccm dello stemperamento di 1 di terra in 1 di acqua. Come indice di misura fu considerato il tempo necessario alla scomparsa completa dei nitrati dalla soluzione.

Risultati: I nitrati risultarono consumati entro 70—72 ore dall'innesto il che denota un piuttosto attivo processo di riduzione.

VI. Misura del potere di azotofissazione. Metodo: In grandi *Erlenmeyer* contenenti 250 ccm di liquido di *Beijerinck* e creta furono innestati 20 ccm dello stemperamento di terra in acqua nel rapporto 1 : 1. Fu coltivato a 24° C. per 40 giorni; indi, determinato l'azoto presente. Questo, detratta la quantità di quello introdotto con il materiale di innesto, venne preso come indice del guadagno ottenuto riferendo i risultati a 1000 di soluzione nutritiva.

Risultati: Come per le altre prove non ci limitammo alla sola determinazione del potere azotofissatore della terra torbosa; ma ne estendemmo la ricerca al liquido in essa presente e ad una buona terra di giardino in presenza o non dello stesso liquido. Ottenemmo:

	g di N presente		guadagno (N g per l di soluzione)
	nel materiale di innesto	nelle colture al 40° giorno	
Terreno di torbiera	0.07 448	0.07 572	0.00 496
Liquido sovrastante lo strato torboso .	0.02 394	0.04 271	0.07 508
Terra di giardino	0.01 427	0.09 340	0.31 652
Id. in presenza del liquido sovrastante lo strato torboso	0.37 365	0.37 379	0.00 056

Come per il potere nitrificante, tali risultati dimostrano che il potere azotofissatore si manifesta assai debolmente e viene quasi completamente inibito dalla presenza dei composti umici solubili, a reazione acida. Cionondimeno la presenza di Azotobatteri non si potette escludere come rilevò l'esame diretto delle colture. Senza dubbio però, su questi, ebbe la prevalenza la flora butirrica essendo assai più numerose, rispetto alle prime, le forme a clostridio. Anche l'attività funzionale di queste, d'altronde, deve praticamente ritenersi assai ridotta. Onde appare lecito concludere che nell'esaminato suolo torboso pur essendo presenti, in numero non elevato, forme azotofissatrici il guadagno microbico in azoto assume scarso valore e che hanno prevalenza, sulle forme aerobie — tipo *Azotobacter* —, le forme anaerobie — tipo *Clostridium Pasteurianum.*

VII. Misura della produzione di anidride carbonica. Metodo: In un recipiente sufficientemente grande e a perfetta tenuta fu messa una quantità di terra corrispondente a 1 kg di sostanza secca. Attraverso questo recipiente venne fatta circolare aria, con adatto dispositivo di aspirazione, priva di CO_2 mentre quella svolta dal terreno veniva raccolta su KOH e pesata.

Risultati. Le determinazioni vennero eseguite per tre giorni consecutivi a 20° C. Ottenemmo:

	mg di CO_2 per 1 kg di terra secca
dopo 24 h	232.1
dopo 2 giorni	168.9
dopo 3 giorni	155.0

Produzione, adunque, molto forte di anidride carbonica e superiore, notevolmente, a quella di altri terreni, pure torbosi, stando alle analisi di *Antoniani*, *Arnaudi* e *Nicolini*. Essi danno infatti le seguenti cifre:

	mg di CO_2 per 1 kg di terra secca (dopo 24 ore)
Torboso a coltura da circa 10 anni	131.5
Torboso a coltura da molti anni	69.5

Si noti che questi ultimi sono terreni da tempo messi a coltura, terreni cioè in cui in gran parte la sostanza organica si è mineralizzata. In via generica, ad ogni modo, i suoli torbosi risultano assai attivi produttori di CO_2.

Nel caso in esame è però da avvertire che l'utilizzazione della CO_2 da parte delle piante non può essere che scarsa, a causa delle Alghe che si sviluppano sul velo liquido sovrastante il terreno e che l'assimilano.

VIII. Decomposizione della cellulosa. La degradazione microbica delle sostanze cellulositiche appare essere nei suoli torbosi assai interessante. Sul campione in studio i numerosi saggi eseguiti ci hanno persuaso che i processi relativi non sono forse così attivi come la quantità di materiali decomponibili consentirebbe ma che ad ogni modo essi si manifestano, pur non sapendo precisare, in mancanza di adeguati mezzi di determinazione, quale dei due — aerobico, anaerobico — abbia la prevalenza.

Del primo, usando all'uopo la ormai nota tecnica di *Winogradsky*, ci fu indice lo sviluppo, non considerevole, di germi riferibili ai generi *Cellvibrio* e *Cellfalcicula*; del secondo, lo sviluppo, anch'esso non abbon-

dante, di forme allungate e sporigene rinvenibili in carta da filtro sommersa nell'adatto liquido di *Omelianski*. Data la non intensa attività non si è potuto accertare, con precisione, quale dei due gas che si svolgono nel processo anaerobico, idrogeno e metano, prevalga. Alcuni saggi eseguiti non ci farebbero escludere la presenza del metano ed anzi ci porterebbero ad ammettere come possibile la formazione di altri composti idrocarburati.

Notiamo di passaggio che la segnalazione non sarebbe priva di interesse nè dal punto di vista teorico, nè pratico. Infatti, mentre la presenza del metano, agli effetti della vegetazione superiore, appare di non grande importanza in quanto ulteriormente ossidato, come è noto, da speciali forme (*Bac. methanicus*), la presenza di altri idrocarburi, probabilmente ostacolanti la vegetazione superiore, è degna di nota non conoscendosi esattamente se, e fino a qual punto, essi possano venire ossidati, comunque demoliti o trasformati in forme non tossiche per le piante.

IX. Produzione d'idrogeno solforato. La produzione d'idrogeno solforato è uno dei tristi attributi che caratterizzano, nella loro maggioranza, i suoli torbosi. La sua origine può essere varia. Dal punto di vista microbiologico noi abbiamo provata la capacità di riduzione dei solfati e dei composti organici solforati eventualmente presenti in strame di torba e la capacità di idrogenare lo zolfo elementare.

Per le prime prove ci siamo valsi di cilindri di vetro pieni dei seguenti liquidi:

1. acqua 1000; asparagina 1; lattato ammonico 5; fosfato bipotassico 0.5; solfato di magnesio 5. 2. id. meno solfato di magnesio sostituito da 5 di solfato di calcio. 3. id. meno solfati sostituiti da strame sterilizzati. furono inoculati con 1 g di terreno torboso, ermeticamente chiusi e coltivati a 24° C.

Al 15 giorno, senza bisogno di procedere a determinazioni analitiche, abbiamo avvertito, in ognuno dei recipienti di coltura, produzione singolarmente *intensa* di idrogeno solforato. *Ovunque*, quindi, era avvenuta riduzione: sia dei solfati solubili (Mg) che insolubili (Ca) che dei composti organici. Gli agenti responsabili furono identificati nel microbio di *Beijerinck* — *Microspira desulfuricans* — agevolmente isolabile e riconoscibile e in altri sotto studio di cui sarà prossimamente riferito.

Nè, meno intensa, apparì l'idrogenazione dello zolfo. Questa fu messa in evidenza in un modo assai semplice: inoculando, cioè, con terreno torboso un recipiente di coltura contenente brodo di fagiuoli addizionato di zolfo. Dopo 15 giorni di coltura a 24° C. fu avvertita una considerevole produzione di H_2S come dimostrava anche l'annerimento di una cartina all'acetato di piombo fissata nella parte interna del tappo del recipiente colturale.

Le prove riferite permettono di mettere in evidenza numerosi fatti relativi allo stato microbiologico dei suoli torbosi. Cioè:

1. Il contenuto quantitativo dei germi appare essere singolarmente scarso.

2. Tra i germi hanno la prevalenza numerica, su altre forme, i funghi.

3. I processi putrefattivi si svolgono lenti, ostacolati della presenza di sostanze tossiche solubili.

4. L'attività nitrificante è praticamente nulla in quanto la funzionalità delle scarse forme specifiche presenti viene ad essere frustrata dalla presenza di sostanze ostacolanti.

5. La denitrificazione è intensa.

6. Il processo di azotofissazione è debole e in prevalenza anaerobio.

7. La produzione di CO_2 è notevole.

8. La decomposizione della cellulosa è non rilevante, con sospetta produzione, nella fase anaerobia, di sostanze nocive.

9. Intensa è la riduzione dei solfati e l'idrogenazione dello zolfo.

In definitiva, sulla scorta di tali reperti, i suoli in parola si dimostrano profondamente alterati nel processo di umo-deumificazione convenendo, con *Perotti*, di chiamare con tale termine il complesso inscindibile dei fatti che portano alla formazione dell'umo e alla sua mineralizzazione.

A rimuovere siffatte circostanze l'uso della calce non si vede come non potrebbe giovare anche dal punto di vista microbiologico; e con l'aggiunta di essa, ancora potranno molto giovare profonde e ripetute lavorazioni intese a creare condizioni di ossibiosi atte ad *ostacolare i processi riduttivi* di questi terreni e a *favorire i processi ossidativi* per cui si abbia, con l'ossidazione, la demolizione delle sostanze tossiche siano esse dovute all'accumulo dei prodotti reflui del metabolismo dei funghi, singolarmente presenti, siano esse elaborate dalla flora butirrica, comunque anaerobica, segnatamente attaccante la cellulosa.

Nel caso speciale, la coltura del riso (che implica per un certo tempo la sommersione del terreno e quindi l'esclusione dell'aria) non si dimostra la più adatta; d'altra parte, le piante crescenti in tali condizioni e minorate nel loro sviluppo e nella loro funzionalità dai prodotti tossici presenti nelle acque e assorbiti, mentre vanno facilmente incontro a disturbi fisiologici con decorso clinico vario negli effetti, in genere grave, agevolmente vengono attaccate da forme anche non parassite che ne aggravano il quadro morboso portandole a morte.

Zusammenfassung.

Es wurde ein oberitalienischer Moorboden aus dem Po-Tal mikrobiologisch untersucht. Die Keimzahl ist sehr niedrig; es handelt sich im wesentlichen um Pilze. Ammoniakbildungs- und Stickstoffbindungsvermögen sind gering, das Nitrifikationsvermögen ist fast Null. Denitrifikations- und CO_2-Bildungsvermögen sind dagegen hoch.

Note.

C. Antoniani, C. Arnaudi e *M. Nicolini*, Reale Ist. Lomb. di Scienze e Lettere **65**, 1127, 1932. — *C. Arnaudi*, Boll. Soc. Int. di Microbiologia **4**, 484, 1932. — *Th. Arnd*, Centralbl. f. Bakt. II, **49**, 1, 1919. — *D. A. Bedak*, Pedology **21**, citato da Makrinow, 1929. — *R. H. Bedford*, Scient. Agric. **9**, 522, 1929. — *N. M. Belikowa*, Torfjanoje dielo **6**, 1929; rec. in Centralbl. f. Bakt. II, **84**, 146, 1931. — *H. R. Christensen*, ebenda II, **17**, 109, 1907. — *G. de Rossi*, Microbiologia Agraria e Tecnica, Torino 1927. — *A. G. Densch*, Landwirtsch. Jahrb. **44**, 331, 1913; zit. n. *Arnd*, Centralbl. f. Bakt. II, **40**, 83, 1914. — *O. Fabricius* e *H. v. Feilitzen*, ebenda II, **14**, 161, 1905. — *D. Feruglio*, Annali Staz. Chimico Agraria di Udine 1933. — *H. Fischer*, Centralbl. f. Bakt. II, **54**, 481, 1921. — *E. Gully*, Landwirtsch. Jahrb. f. Bayern **6**, 1, 1916. — *S. Logwinowa*, Arbeit. d. wissenschaftl. Instit. f. Düngung **56**, citato da *Makrinow*. — *J. A. Makrinow*, Centralbl. f. Bakt. II, **89**, 201, 1933. — *R. Perotti*, Lez. di Pat. Veg. e Batteriologia **4**, 1, 1934. — *Th. Remy*, Centralbl. f. Bakt. II, 8, 657, 1902. — *G. A. Ritter*, Centralbl. f. Bakt. II, **34**, 577, 1912. — *S. A. Waksman* e *K. R. Stevens*, Soil Science **38**, 1928.

(Aus dem Institut für Biochemische Technologie an der Technischen Hochschule in Wien und der Biologischen Station Lunz am See.)

Mikrobiologische Bodenuntersuchungen im Lunzer Gebiet[1].

II. Teil: Die Bakterienflora.

Von

Alexander Janke und Maria Wozak.

(Eingegangen am 9. März 1934.)

Im ersten Teil[2] dieser Arbeit, die sich die Erforschung des ökologischen Zusammenhangs zwischen der Mikroorganismenflora und den Standortsfaktoren in den Böden von sieben kleinklimatischen Stationen des Lunzer Gebietes zur Aufgabe gestellt hat, wurde über den Bestand an den verschiedenen Gruppen von Mikroorganismen im allgemeinen berichtet und zugleich versucht, eine Beziehung zu den Umweltfaktoren aufzudecken. Im vorliegenden zweiten Teil soll die Zusammensetzung der Bakterienflora und die Verteilung der physiologischen Bakteriengruppen näher untersucht werden. Die Namen der einzelnen kleinklimatischen Stationen, sowie die Bezeichnung der Bodenproben, ihr Wasser- und Bakteriengehalt geht aus Tabelle I hervor.

A. Die kollektive Bakterienflora. Das relative Mengenverhältnis der einzelnen Gattungen und Arten. Der Gemeinschaftsquotient.

Die bei der Ermittlung der Keimzahl nach dem Plattenverfahren auf Asparagin-Mannit-Agar[2] erhaltenen Kolonien dienten zur Isolierung und Identifizierung der aerob wachsenden kollektiven Bakterienflora d. h. jener Bakterien, die auf den allgemeinen, den sog. kollektiven Bakteriennährboden bei Luftzutritt Entwicklung zeigten. Zunächst mußte die Einheitlichkeit der erhaltenen Kolonien durch nochmaliges bzw. mehrmaliges Plattengießen überprüft werden. Ließ schließlich die Gleichartigkeit der erhaltenen Kolonien an der Reinheit der Kulturen nicht mehr zweifeln, so konnte zur Identifizierung der isolierten Stämme geschritten werden, wozu außer den Standardnährböden, nämlich Nährbouillon, Nährgelatine, Nähragar, Traubenzuckeragar, Peptonwasser, Kartoffelnahrboden, Milch und Heudekokt, auch noch Lackmusbouillon (mit 0,5 % Glucose) und Nitratbouillon (mit 0,1 % KNO_3) Verwendung fanden[3].

[1] Ausgeführt mit Unterstützung der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft. — [2] Vgl. *A. Janke, F. Sekera* u. *A. Szilvinyi*, diese Zeitschr. 5, 223—245, 1934. — [3] Bezüglich Bereitung und Verwendung der Nährböden für diagnostische Zwecke vgl. *Janke-Zikes*, Arbeitsmethoden der Mikrobiologie. Dresden und Leipzig 1928.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Station	Probe *	Wassergehalt ** in g H_2O je 100 g Boden		Bakteriengehalt *** in Millionen Keimen in der Trockensubstanz		Umrechnungsfaktoren ***		
		naturfeucht	lufttrocken	je 1 g	je 1 ccm	a	b	c
Mitterseeboden (770 m)	*Mn*	48,6 (94,6)	31,9 (46,8)	781,4	1836,4	0,681	0,153	0,079
	Mn_u	31,3 (45,6)	25,8 (34,8)	282,9	614,0	0,742	0,252	0,173
Schreier (780 m)	*Sr*	70,3 (236,7)	58,2 (139,2)	58,6	100,2	0,418	0,481	0,143
Seekopfsattel (790 m)	*Sl*	29,4 (41,6)	23,5 (30,7)	72,1	152,9	0,765	0,4	0,283
	Sl_u	44,2 (79,2)	10,3 (11,5)	52,1	113,0	0,897	0,349	0,195
Nos (1022 m)	*Ns*	67,2 (204,9)	32,2 (47,5)	12,4	23,6	0,678	0,910	0,299
Finstergstaud (1110 m)	*Fd*	52,1 (108,8)	30,2 (43,3)	237,1	395,9	0,698	0,202	0,097
Gstettneralm (1270 m)	*Gm*	56,2 (128,3)	50,2 (100,8)	490,1	1081,9	0,498	0,630	0,276
	Gm_u	64,1 (178,6)	17,7 (21,5)	14,7	35,5	0,823	0,277	0,099
Meisterau (1530 m)	*Mu*	27,2 (37,4)	15,4 (18,2)	781,2	1445,1	0,846	0,223	0,162
	Mu_u	27,2 (37,4)	16,1 (19,2)	10,3	25,1	0,839	0,147	0,107

* Die Proben stammen aus einer mittleren Tiefe von 5 cm (3 bis 7 cm) bzw — wo die örtlichen Verhältnisse es gestatteten — auch aus einer solchen von 10 cm (8 bis 12 cm), die Bezeichnung der letztgenannten erfolgte durch Anfügung des Index *u* (= *unten*) an die abgekurzten Stationsnamen — ** Die Zahlen in den Klammern geben den Wassergehalt in g je 100 g Bodentrockensubstanz an. — *** Um einen Bezug der Keimzahlen auf das Bodenvolumen zu ermöglichen, wurde der Bakteriengehalt auf 1 g bzw 1 ccm Trockensubstanz der von groberen Bestandteilen (Steinen, Wurzeln usw.) durch ein 2-mm-Sieb befreiten Aufschlämmungen der Bodenproben berechnet. Man erhält durch Multiplikation der in Spalte 5 angegebenen Keimzahlen je 1 g Trockensubstanz mit dem Umrechnungsfaktor

a) den Keimgehalt je 1 g lufttrockenen Boden (gesiebt),
b) „ „ „ 1 g Trockensubstanz des Originalbodens,
c) „ „ „ 1 g naturfeuchten Originalbodens.

Auf eine Beschreibung der isolierten Stämme muß aus Raummangel verzichtet werden; zur Bezeichnung derselben dienten fortlaufende arabische Ziffern, die dem Buchstaben *L* (Abkürzung für *Lunz*) angefügt wurden. In gleicher Weise sind auch jene Arten benannt, die sich mit keiner der bereits bekannten als identisch erwiesen. Die isolierten 37 Arten verteilten sich auf die einzelnen Gattungen wie folgt:

Streptococcus:	1	Art mit	1	Stamm
Micrococcus:	6	Arten mit	9	Stämmen
Sarcina:	2	„ „	2	„
Bacillus:	14	„ „	42	„
Pseudomonas:	4	„ „	26	„
Bacterium:	10	„ „	28	„

In mindestens sechs Proben von den untersuchten elf, also in über 50 % der Proben, fanden sich vor: *Bac. mycoides, Bac. sphaericus, Bac. fusiformis, Bac. cereus, Bac. tumescens, Bac. vulgatus, Bac. mesentericus, Pseudomonas fluorescens, Ps. putida, Ps. aeruginosa, Bact. coli* und *Bact. L 98*; von diesen waren *Bac. fusiformis, Bac. tumescens* und *Ps. fluorescens* in sämtlichen Proben enthalten.

Tabelle II gibt Aufschluß über das relative Mengenverhältnis, ausgedrückt in Prozenten, in dem die einzelnen Arten, Artengruppen, Gattungen und Familien der kollektiven Bakterien auf den verschiedenen kleinklimatischen Stationen angetroffen wurden; die sogenannten physiologischen Gruppen sind demnach in der Gesamtzahl nur insoweit inbegriffen, als sie auf dem verwendeten Asparagin-Mannit-Agar zur Entwicklung kamen.

Um eine ökologische Auswertung der Ergebnisse zu erleichtern, wurde versucht, eine dem *Gemeinschaftskoeffizienten* von *Jaccard*[1] entsprechende Beziehung zu verwenden. Unter diesem versteht man den Anteil der zwei Arealen gemeinsamen Arten von Organismen an der Gesamtzahl der vorkommenden Arten, ausgedrückt in Prozenten. Dieser Koeffizient erreicht einen um so höheren Wert, je ökologisch gleichartiger die verglichenen Gebiete sind. Auf den vorliegenden Fall angewendet, ließen sich jedoch keine besonderen Gesetzmäßigkeiten erkennen, was offenbar darin seinen Grund hat, daß die meisten Arten der Bakterien auf einen Wechsel der Umweltbedingungen innerhalb eines engen klimatischen Bereiches zu gleichartig reagieren, und daß die Artabgrenzung bei diesen Mikroorganismen zu wenig scharf ausgeprägt ist, als daß die Artenzahl eine brauchbare Bezugsgröße für die ökologische Bewertung der Standorte abgeben konnte.

Mehr Aussicht auf Erfolg versprach der Versuch, die Zahl der Individuen, mit der eine Gattung oder besser eine Familie an dem gesamten Bakterienbestand einer bestimmten Station beteiligt ist, als Vergleichswert zu wählen. Bringt man diese Zahl in Beziehung zu jener einer gewählten Bezugsstation, so ergibt sich eine Verhältniszahl, die „*Gemeinschaftsquotient*" (Q) genannt werden soll; dieser ist demnach definiert durch die Formel $Q = n/N$, worin bedeuten: n den prozentualen Anteil der fraglichen Gattung bzw. Familie an der Gesamtkeimzahl der zu kennzeichnenden Station,

[1] *P. Jaccard*, Handb. d. biol. Arbeitsmethod., Abt. XI, Teil V, 165, 1928.

Tabelle II.

	Mn	Mn_u	Sr	Sl	Sl_u	Ns	Fd	Gm	Gm_u	Mu	Mu_u
Micrococcaceae	**5,46**	**3,73**	**2,16**	**2,10**	—	**2,90**	**0,69**	**0,039**	**4,99**	**0,30**	**1,25**
Streptococcus	0,89	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Streptococcus sp. L 1 *											
Micrococcus	**4,57**	**3,73**	**2,16**	**1,77**	—	**2,90**	**0,69**	**0,033**	**4,99**	**0,30**	**0,31**
M. candicans	4,10	0,58	0,58	1,77	—	2,01	—	—	—	0,30	0,31
Micrococcus sp. L 5 **	0,47	0,001	0,01	—	—	0,89	0,69	—	—	—	—
M. subcitreus	—	0,396	1,56	—	—	—	—	—	—	—	—
M. flavus	—	—	—	—	—	—	—	0,022	4,99	—	—
M. sulfureus	—	2,753	0,01	—	—	—	—	—	—	—	—
Micrococcus sp L 10 ***	—	—	—	—	—	—	—	0,011	—	—	—
Sarcina	—	—	—	**0,33**	—	—	—	**0,006**	—	—	**0,94**
S. alba	—	—	—	—	—	—	—	0,006	—	—	0,94
S. lutea	—	—	—	0,33	—	—	—	—	—	—	—
Bacillaceae	**51,27**	**44,66**	**26,85**	**22,52**	**6,85**	**12,79**	**14,10**	**57,011**	**52,65**	**61,70**	**62,05**
Bacillus											
Mycoides-Gruppe	*4,66*	*2,45*	*4,52*	—	—	—	—	*0,201*	*3,25*	*1,71*	*14,11*
Bac. mycoides											
Sphaericus-Gruppe	*20,36*	*4,28*	*17,57*	*10,41*	*1,36*	*7,20*	*8,69*	*16,846*	*38,99*	*20,11*	*25,35*
Bac. sphaericus	—	0,03	0,02	0,50	0,55	—	—	0,006	—	1,16	2,76
Bac. fusiformis	20,36	4,25	17,55	9,91	0,75	7,20	8,69	16,70	38,99	18,79	10,04
Bac asterosporus	—	—	—	—	0,06	—	—	0,14	—	0,16	12,55
Cereus-Gruppe	*4,78*	*0,03*	*1,46*	*4,62*	*1,09*	*0,31*	—	—	*2,82*	*1,37*	*8,16*
Bac cereus	4,69	0,03	1,46	4,62	1,09	—	—	—	1,30	1,30	2,51
Bac. teres	—	—	0,10	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. albolactis	0,09	—	0,39	—	—	0,31	—	—	1,52	0,07	5,65
Subtilis-Gruppe	*0,02*	*0,12*	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac subtilis											

* *Streptococcus sp. L 1* bildet in Milch keine Saure. — ** *Micrococcus sp. L 5,* dem *M. albus* nahestehend; jedoch wird Milch bei schwach alkalischer Reaktion fadenziehend, später tritt Peptonisierung ein. — *** *Micrococcus sp. L10,* dem *M. sp. L 5* ähnlich, jedoch auf Gelatine, Agar und Kartoffel Bildung eines ziegelroten bis braunroten Farbstoffs.

Tabelle II (Fortsetzung).

	Mn	*Mn*$_u$	*Sr*	*Sl*	*Sl*$_u$	*Ns*	*Fd*	*Gm*	*Gm*$_u$	*Mu*	*Mu*$_u$
Megaterium Gruppe	*13,38*	*1,02*	*2,48*	*1,04*	*2,97*	*5,28*	*5,41*	*0,82*	*6,50*	*3,07*	*4,08*
Bac. megaterium	—	—	0,97	—	—	—	—	0,02	—	1,16	4,08
Bac. tumescens	13,33	0,30	1,51	1,04	2,55	5,28	5,41	0,80	6,50	1,91	—
Bac. silvaticus	0,05	0,60	—	—	0,24	—	—	—	—	—	—
Bac graveolens	—	0,12	—	—	0,18	—	—	—	—	—	—
Mesentericus-Gruppe	*8,07*	*36,76*	*0,82*	*6,45*	*1,43*	—	—	*39,144*	*1,09*	*35,44*	*10,35*
Bac. vulgatus	6,45	36,65	0,82	—	—	—	—	38,47	1,09	35,39	7,53
Bac mesentericus	1,62	0,11	—	6,45	1,43	—	—	0,674	—	0,05	2,82
Bacteriaceae	**43,27**	**51,61**	**71,00**	**75,38**	**93,15**	**84,31**	**85,21**	**42,95**	**42,36**	**38,00**	**36,70**
Pseudomonas	**28,18**	**48,03**	**64,22**	**71,65**	**90,30**	**83,24**	**85,21**	**42,48**	**38,45**	**34,87**	**17,25**
Ps. fluorescens	27,73	47,50	61,69	71.36	90,30	79,70	73,67	42,16	21,02	34,37	17,25
Ps. putida	0,35	0,53	1,70	0,29	—	0,05	8,19	0,06	2,17	—	—
Ps. aeruginosa	0,05	—	0,83	—	—	2,55	3,35	0,24	1,08	—	—
Ps. fuscans	0,05	—	—	—	—	0,94	—	0,02	14,18	—	—
Bacterium	**15,09**	**3,58**	**6,77**	**3,73**	**2,85**	**1,07**	—	**0,47**	**3,91**	**3,63**	**19,45**
Coli Cloacae Gruppe	*14,22*	*1,66*	*5,80*	*3,73*	*1,82*	*1,03*	—	*0,34*	*1,95*	*0,69*	*1,88*
Bact coli	13.98	1,66	5,30	3,73	1,82	1,03	—	0,32	1,08	0,65	1,88
Bact. cloacae	0,24	—	0,50	—	—	—	—	0,02	0,87	0,04	—
*Chromobacter Gruppe** . . .	*0,01*	*1,60*	*0,58*	—	*0,24*	—	—	—	*0,22*	—	*11,30*
Bact. herbicola	0,01	0,925	—	—	0,24	—	—	—	—	—	6,59
Bact. aurescens	—	—	0,43	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. prodigiosum	—	—	—	—	—	—	—	—	0,22	—	1,57
Bact. violaceum	—	0,015	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. fuscans	—	0,66	0,15	—	—	—	—	—	—	—	3,14
Achromobacter-Gruppe . . .	*0,86*	*0,325*	*0,39*	—	*0,79*	*0,04*	—	*0,13*	*1,74*	*2,94*	*6,27*
Bact. sp L 98 **	0,09	0,31	0,05	—	0,79	—	—	—	1,74	2,94	5,96
Bact. viscosum	0,65	0,015	0,34	—	—	0,04	—	0,13	—	—	0,31
Bact. Stutzeri	0,12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* Die Gruppe *Chromobacter* hat mit dem Genus *Chromobacterium Bergonzoni* nichts zu tun. — ** *Bact. (Achromobacter) L 98* koaguliert Milch bei alkalischer Reaktion, später Peptonisierung; säuert und vergärt Glucose nicht.

N den prozentualen Anteil derselben Gattung bzw. Familie an der Gesamtkeimzahl der Bezugsstation.

Als Bezugsstation soll im vorliegenden Falle *Seekopfsattel* (*Sl*) gewählt werden, da dieser in klimatischer Hinsicht eine Mittelstellung einnimmt und auch die Bakterienflora eine ziemlich gleichmäßige Verteilung auf die einzelnen Gattungen bzw. Arten aufweist. Natürlich kann sich dieser Vergleich nur auf die aus den oberen Bodenschichten entnommenen Proben erstrecken. Bei den Bakterien ist zur Zeit selbst die Abgrenzung der Gattungen noch vielfach unsicher, weshalb es am zweckmäßigsten erschien, die Familie als systematische Bezugseinheit zu wählen. Je ähnlicher die zu kennzeichnende Station in okologischer Hinsicht der Bezugsstation ist, um so mehr wird sich der Gemeinschaftsquotient der Zahl 1 nähern, und die Ähnlichkeit verschiedener zu kennzeichnender Stationen untereinander kommt dann in ihren Gemeinschaftsquotienten derart zum Ausdruck, daß diese ungefähr die gleichen Werte aufweisen, zumindest aber in gleichem Sinne von 1 abweichen, also beide entweder oberhalb oder unterhalb von 1 liegen.

Tabelle III.

	Ns	*Fd*	*Sl*	*Sr*	*Mn*	*Gm*	*Mu*
Bacillaceen	0,57	0,63	1	1,19	2,28	2,52	2,74
Bacteriaceen	1,12	1,13	1	0,94	0,57	0,57	0,50
Micrococcaceen	1,38	0,33	1	1,03	2,60	0,02	0,14

Aus der Tabelle III können die Gemeinschaftsquotienten der einzelnen kleinklimatischen Stationen, bezogen auf die Station *Seekopfsattel* (*Sl*), für die Familien der *Bacillaceen*, *Bacteriaceen* und *Micrococcaceen* in Erfahrung gebracht werden. Es ergibt sich zunächst die auffallende Tatsache, daß bezüglich des Gehaltes an *Bacillaceen* und *Bacteriaceen* die Stationen *Nos* und *Finstergstaud* einerseits, *Gstettneralm* und *Meisterau* andererseits, denen sich noch *Mitterseeboden* anschließt, ökologisch gleichartig erscheinen, während *Schreier* (*Sr*) der Bezugsstation *Seekopfsattel* in ökologischer Hinsicht am ähnlichsten wäre. Bei den *Micrococcaceen* hingegen ist eine solche Gesetzmäßigkeit zu vermissen. Diese Verhältnisse sollen nun näher betrachtet werden.

1. *Die Bacillaceen.*

Die *Bacillus*-Arten werden als Sporenbildner durch starke Schwankungen der Standortsfaktoren begünstigt werden, da die Nichtsporenbildner (vor allem die Stäbchenbakterien) durch solche inkonstante Verhältnisse wohl leicht Schaden leiden dürften. Hierfür kommen in Betracht: zeitweise intensive Bestrahlung und, damit zusammenhängend, starke Schwankungen der Bodentemperatur, ferner bedeutende Schwankungen der Feuchtigkeit, die sich vor allem dann auswirken werden, wenn die Menge des für das Mikrobenleben bedeutungsvollen „*träge beweglichen*“ Bodenwassers gering ist und es vorübergehend zur Austrocknung des Bodens kommt; ferner dürften auch stärkere Ände-

rungen der Wasserstoffionenkonzentration eine Rolle spielen, wie solche in schlecht gepuffertem Boden auftreten können. Die einzelnen Stationen bzw. Bodenproben zeigten diesbezüglich folgendes Verhalten:

a) *Einstrahlung*: am stärksten auf *Gm*, *Mu* und *Sl*.

b) *Temperaturschwankungen im Boden*: < 9° C: *Sr*, *Ns*, *Mn*, *Fd*;
> 9° C: *Mu*, *Sl*, *Gm*.

c) „*Träge bewegliches*" *Bodenwasser*, das sich als Differenz aus dem „kritischen Wassergehalt" (k) nach *Sekera*[1] und dem „gebundenen Wasser" (H) ergibt.

$k - H =$ < 20: *Mn*;
20—30: *Ns*, *Sl*, *Fd*;
> 30: *Gm*, *Mu*, *Sr*.

d) *Austrocknung des Bodens*, diese hängt ab

α) vom *Wert e*, der die Gramme Wasser angibt, die je ccm Bodenoberfläche und Stunde bei maximalem Saugkraftgefälle (absolut trockener Luft) verdunsten. Aus der durch *Sekera*[2] an einem umfangreichen Material experimentell ermittelten *e*—*k*-Kurve lassen sich die *e-Werte* ablesen; es beträgt $e \cdot 10^2$, d. h. die je qdm und Stunde abgegebene Wassermenge

3 g bei *Sr*, *Fd*, *Mu*;
3,5—4 g „ *Sl*, *Ns*;
5,5—6 g „ *Mn*.

β) von der *Stärke der Luftbewegung*; diese ist am lebhaftesten auf den Stationen *Mitterseeboden* und *Meisterau*.

γ) von der *Lufttemperatur*; die mittleren Schwankungen derselben während der neun Ablesewochen waren

< 20° C: *Ns*, *Fd*, *Mn*;
20—30° C: *Mu*, *Sr*, *Sl*;
> 30° C: *Gm*.

δ) vom *Untergrund*; wenn dieser viel Luft einschließt, was bei Schotter der Fall ist, wird die Austrocknung begünstigt, so bei *Mitterseeboden*.

e) *Pufferung*. Wie *Fehér*[3] gezeigt hat, kann der p_H der Boden im Verlauf eines Jahres bedeutende Änderungen erleiden; es wird daher die Pufferung, die wieder mit dem Ca-Mg-Verhältnis zusammenhängt, eine entscheidende Rolle spielen.

Niedriges Ca-Mg-Verhältnis und daher *gute Pufferung*: *Fd*, *Ns*, *Sr*, *Mn*.

Daß *Nos* und *Finstergstaud* trotz bedeutender Höhenlage ein niedriges Ca-Mg-Verhältnis aufweisen, ist durch dolomitischen Untergrund bedingt.

Hohes Ca-Mg-Verhältnis und *schlechte Pufferung*: *Sl*, *Gm*, *Mu*.

Die Begünstigung der Bazillen auf *Gstettneralm* und *Meisterau* ist demnach offenbar in erster Linie auf starke Strahlenwirkung und bedeutende Temperaturschwankungen zurückzuführen; begünstigend dürfte auch noch die schlechte Pufferung wirken. Bei *Mitterseeboden* hingegen ist der Wasserhaushalt des Bodens dem Auftreten der Bazillen

[1] Vgl. den ersten Teil dieser Arbeit. — [2] *F. Sekera*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung u. Bodenkde. (A)26, 113, 1932. — [3] *D. Fehér*, Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin 1933.

insofern günstig, als wenig „*träge bewegliches*" Bodenwasser vorhanden ist, und infolge des hohen *e-Wertes*, des schottrigen Untergrundes und der bedeutenden Luftbewegung leicht vorübergehend Austrocknung eintreten kann. Den geringsten Bazillengehalt und demnach einen unter 1 liegenden Gemeinschaftsquotienten weisen die Stationen *Nos* und *Finstergstaud* mit ihrem gleichmäßigen Klima, ihrer guten Pufferung und einer geringen Neigung zur Austrocknung auf. Beachtenswert erscheint noch die Tatsache, daß auf den beiden letztgenannten Stationen eine höheren Temperaturen angepaßte Bazillenart, nämlich *Bac. fusiformis* (Opt. 35° C), vorherrschend ist.

2. *Die Bacteriaceen.*

Unter diesen sind es vor allem die höhere Feuchtigkeitsgrade liebenden und auch zumeist ein niedriges Temperaturoptimum aufweisenden *Pseudomonas*-Arten, deren Vorkommen auf den einzelnen Böden jenem der Bazillen entgegengesetzt ist. Die *Pseudomonas*-Arten finden sich demnach zu einem hohen Prozentsatz gerade in jenen Böden, die relativ arm an Bazillen sind und — wie *Nos* und *Finstergstaud* — eine gleichförmige Temperatur oder — wie *Seekopfsattel* — nur geringe Schwankungen der Bodenfeuchtigkeit aufweisen. Während diese Feststellungen im Einklang mit jenen von *Fehér* stehen, ergab sich jedoch keine Bestatigung fur seine Behauptung, daß ein niedriger p_H-Wert (also saure Reaktion) die Nichtsporenbildner und ein hoher p_H-Wert die Bazillen begünstigt, da die *Bacteriaceen* im allgemeinen und die *Pseudomonas*-Arten im besonderen ihre höchsten Prozentzahlen gerade in den alkalische Reaktion aufweisenden Proben (*Ns*, *Fd*, *Sr*) oder aber in jenen von schwach saurer Raktion (*Sl*, Sl_u) erreichen, während in den sauren Bodenproben (*Gm*, *Mu*) nur geringe Mengen von ihnen gefunden wurden. Die durch *Fehér* beobachtete Gesetzmäßigkeit dürfte dadurch zustande gekommen sein, daß sich der Wasserstoffexponent mit einem anderen Standortsfaktor (Temperatur, Feuchtigkeit) — offenbar infolge schlechter Pufferung des Bodens — korrelativ änderte, wodurch dann der Wasserstoffexponent irrtümlich als der das Auftreten der *Pseudomonas*-Arten bzw. Bazillen begünstigende Faktor angesehen wurde. Vermerkt sei noch die auffällige Tatsache, daß die unter den vorgefundenen *Pseudomonas*-Arten das höchste Temperatur-Optimum aufweisende *Ps. aeruginosa* in den Bodenproben der Stationen *Nos* und *Finstergstaud*, die das gleichförmigste Klima aufweisen, in den höchsten Prozentzahlen anzutreffen war.

3. *Die Micrococcaceen.*

Wie aus der Tabelle III hervorgeht, läßt sich bei den *Micrococcaceen* zum Unterschied von den *Bacillaceen* und *Bacteriaceen* im Gemeinschaftsquotient keine Gesetzmäßigkeit erkennen, was darauf hindeutet,

daß es sich bei den Angehörigen dieser Familie um keine autochthone Flora handelt, dieselben vielmehr wahrscheinlich durch die Luft auf die Stationsböden übertragen wurden. Es ist auffällig, daß die höchstgelegenen Stationen *Gstettneralm* und *Meisterau*, wo die Luft offenbar den geringsten Keimgehalt aufweist, im Boden die wenigsten Kokken enthielten, während die tief gelegene Station *Mitterseeboden* mit ihrer relativ starken Luftbewegung den höchsten Kokkengehalt im Boden erkennen ließ.

B. Der Einfluß der einzelnen Standortsfaktoren auf die Zusammensetzung der Bakterienflora.

Wie aus den obigen Ausführungen hervorgeht, dürfte den Standortsfaktoren Temperatur und Feuchtigkeit der dominierende Einfluß auf die Zusammensetzung der Bakterienflora zukommen; letzterdings wird die Strahlungsintensität der Sonne von ausschlaggebender Bedeutung sein, worauf bereits *Fehér* hingewiesen hat.

1. Die Temperatur als dominierender Umweltfaktor. a) Bedeutende Schwankungen derselben, vor allem infolge starker Sonnenbestrahlung, begünstigen die Bazillen gegenüber den Nichtsporenbildnern, vor allem den *Pseudomonas*-Arten (Mu, Mu_u, Gm, Gm_u).

b) Ein gleichförmiges gemäßigtes Temperaturklima begünstigt das Auftreten einer mesophilen Bakterienflora, so von *Ps. aeruginosa* und *Bac. fusiformis* auf *Nos* und *Finstergstaud*.

2. Die Feuchtigkeit als dominierender Umweltfaktor. Für die Bakterienentwicklung maßgebend ist vor allem das „*träge bewegliche*" Bodenwasser und hiermit im Zusammenhang der *e-Wert* für die Verdunstung. Ein geringer Wert für jenes und hohe *e-Werte* bei zeitweiser starker Durchlüftung des Bodens begünstigen die Entwicklung der Bazillen selbst dann, wenn die anderen Bedingungen für das Wachstum der Nichtsporenbildner noch so günstig sind (vgl. Mn und Mn_u gegenüber Ns und Fd). Ist der Wassergehalt des Bodens nur geringen Änderungen unterworfen, so können *Pseudomonas*-Arten selbst bei stärkeren Temperaturschwankungen gefördert werden (Sl, Sl_u).

Mit dem Wasserhaushalt des Bodens im Zusammenhang steht offenbar auch das sogenannte „*Dolomitphänomen*", d. h. das Auftreten einer hochalpinen Pflanzengesellschaft auf Dolomitboden, wo auf Kalk in gleicher Höhenlage noch montane Vegetation dominiert, wie dies auch *Ruttner*[1] vermutete. Jedoch ist hierfür nicht, wie dieser meint, die geringe Wasserkapazität verantwortlich zu machen, sondern vielmehr die geringe Menge an „beweglichem Wasser", das durch die höhere Pflanze genutzt werden kann und sich als Differenz aus der

[1] *F. Ruttner*, Mitt. d. Geograph. Gesellsch. Wien, 74, 353—370, 1931.

Wasserkapazität und dem „kritischen Wassergehalt" nach *Sekera* ergibt. So unterscheiden sich die Bodenproben der auf Dolomitunterlage stehenden Stationen *Nos* und *Finstergstaud* von dem bodenkundlich ganz ähnlichen Boden der Station *Mitterseeboden* durch einen geringen Gehalt an beweglichem Wasser (11,1 und 6,0 Vol.-% gegen 20,2 Vol.-%), wodurch bei den höheren Pflanzen zeitweilig ein Wasserhunger eintritt, der durch die meist nur flache Bewurzelung begünstigt wird.

3. Vom Wassergehalt des Bodens hängt auch dessen *Durchlüftung* ab. Für diese ist maßgebend die Luftkapazität, die sich als Differenz aus Porenvolumen und Wasserkapazität errechnet.

Luftkapazität < 10: Gm_u, *Sr*;
10—20: Mu_u, *Sl*, Sl_u, *Mu*;
> 20: *Fd*, Mn_u, *Mn*, *Ns*.

Hohe Luftkapazität des Bodens begünstigt die Nitrifikation gegenüber der Denitrifikation (*Mn*, Mn_u, *Ns*, *Fd*); bei Gm_u und Mu_u ist die niedrige Zahl der Denitrifikanten auf die geringe Menge an energetisch verwertbarer Substanz zurückzuführen.

4. Der *Wasserstoffionenkonzentration* scheint keine allzu große Bedeutung zuzukommen; auf jeden Fall konnte im Gegensatz zu *Fehér* kein Zusammenhang zwischen ihr und dem relativen Verhältnis zwischen Bazillen und Nichtsporenbildnern beobachtet werden. Nur bei den Stickstoffbindern[1] zeigt sich insofern eine Beeinflussung, als dieselben im allgemeinen bei alkalischer Reaktion besser gedeihen, wenn auch im Waldboden selbst bei saurer Reaktion noch eine Entwicklung aerober Stickstoffbinder beobachtet werden kann (*Gm*, Gm_u, *Mu*, Mu_u). *Amylobacter*[1] scheint auch auf gute Pufferung Wert zu legen (*Mn*, *Ns*, *Fd*), wie denn überhaupt die Pufferung des Bodens für manche Mikroorganismen von Bedeutung sein dürfte.

5. *Mangel an energetisch verwertbarer Substanz* kann die Mikrobenentwicklung auch unter sonst günstigen Umständen zurückhalten. So fällt die geringe Zahl der Anaerobier[1] in den tieferen Schichten der Stationen *Gstettneralm* (Gm_u) und *Meisterau* (Mu_u) auf, während doch sonst gerade in mangelhaft durchlüfteten Schichten die luftscheuen Mikroben in relativ höherer Zahl anzutreffen sind.

Organische Substanz in Gewichtsprozenten:
< 20: Mu_u, Gm_u;
20—30: Sl_u, *Mn*, Mn_u, *Sl*, *Gm*;
30—40: *Ns*, *Mu*;
40—45: *Sr*, *Fd*.

[1] Betreffend das Vorkommen der physiologischen Bakteriengruppen in den einzelnen Stationsböden sei auf den ersten Teil vorliegender Arbeit verwiesen.

Bildet man das Verhältnis des Gehalts an Anaerobiern in den Bodenproben aus den oberen und den tieferen Schichten, so erhält man die folgenden Werte:

$$\frac{Mn}{Mn_u} = 0{,}98; \quad \frac{Sl}{Sl_u} = 0{,}93; \quad \frac{Gm}{Gm_u} = 8{,}76; \quad \frac{Mu}{Mu_u} = 3{,}18.$$

Zusammenfassung.

1. Aus elf Bodenproben von sieben kleinklimatischen Stationen des *Lunzer* Gebietes wurden 108 Stämme von 37 verschiedenen kollektiven Bakterienarten isoliert. *Bac. fusiformis*, *Bac. tumescens* und *Ps. fluorescens* erwiesen sich als allgemein verbreitet; sie fanden sich in sämtlichen Bodenproben vor.

2. In Übereinstimmung mit *Fehér* haben sich Temperatur und Feuchtigkeit als die dominierenden Standortsfaktoren erwiesen. Bedeutende Temperaturschwankungen infolge starker Einstrahlung (*Gm*, *Mu*) sowie niedrige Werte fur das „*trage bewegliche*" Bodenwasser mit vorubergehender Austrocknung (*Mn*) begünstigen die Entwicklung der Bazillen, wahrend eine gleichmaßige Wirkung der Umweltfaktoren die Vermehrung der nichtsporenbildenden Stabchenbakterien, vor allem der *Pseudomonas*-Arten, fordert (*Ns*, *Fd*). Die Kokken scheinen nicht zur autochthonen Bakterienflora zu gehoren, vielmehr uber die Luft in den Boden zu gelangen, weshalb sie in hoheren Lagen (*Gm*, *Mu*) nur in geringer Menge anzutreffen sind, wahrend sie sich in tieferen Lagen mit starker Luftbewegung (*Mn*) relativ am meisten vorfinden.

Als zahlenmaßiger Ausdruck fur die relative Verbreitung der Bakterienfamilien wurde der *Gemeinschaftsquotient* gepragt.

3. Auf den Stationen mit gleichformigen Standortsfaktoren, vor allem mit gemaßigter Temperatur (*Ns*, *Fd*), war eine mesophile Bakterienflora (*Bac. fusiformis*, *Ps. aeruginosa*) relativ am reichlichsten anzutreffen.

4. Das sog. „*Dolomitphanomen*" durfte mit der geringen Menge an „beweglichem Bodenwasser" (*Ns*, *Fd*) im Zusammenhang stehen.

5. Die absoluten Werte für die *Wasserstoffionenkonzentration* scheinen auf die Bakterienflora (mit Ausnahme der zumeist alkalische Reaktion bevorzugenden Stickstoffbinder) im allgemeinen keinen besonderen Einfluß auszuüben, eher dürfte die *Pufferung* eine Rolle spielen.

6. Hohe *Luftkapazitat* des Bodens begünstigt die Nitrifikation gegenuber der Denitrifikation (*Mn*, Mn_u, *Ns*, *Fd*).

7. Mangel an *energetisch verwertbarer Substanz* kann der Mikrobenentwicklung auch unter sonst günstigen Umständen hinderlich sein, wie dies die geringe Zahl von Anaerobiern in den tieferen Bodenschichten der Stationen *Gstettneralm* und *Meisterau* beweist.

(Department of Bacteriology, University of Illinois, Urbana.)

The effect of ultraviolet light on the fermenting ability of Yeasts.

By

Fred W. Tanner and **J. Roy Byerley.**

(Eingegangen am 11. März 1934.)

During recent years exposure to ultraviolet light has been found to bestow interesting properties on different materials concerned in development of living things. Water has been said to retain germicidal action for some time after exposure and interesting properties are contributed to foods. More recently reports have appeared in literature which indicate that ultraviolet light may markedly increase the rate of fermentation and reproduction by yeast cells and even contribute to the unfermented substrate, a greater ability to be fermented. Such statements are interesting from the standpoint of cellular physiology and justify experiments to confirm or refute them.

Lohmann (1896) reported that intense light retarded the development of *Saccharomyces cerevisiae*, a *Torula* species, and *Saccharomyces Pastorianus I.* While he did not work with ultraviolet light, his conclusions have some relation, however, to this discussion. *Buchta* (1915) reported light to have greater effects on yeasts cells than were reported by *Lohmann.* Using *Saccharomyces Ludwigii* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Buchta* reported that exposure for 10 seconds arrested reproduction and that the cells were killed by exposure for more than three minutes. *Fazi* (1915) by exposing a solution of dextrose inoculated with *beer yeast* to the radiation from a 1200 candle-power *Cooper-Hewitt* mercury vapor lamp operating at 110 volts and 4 amperes at a distance of 20 cm reported that twice as much carbon dioxide was formed than was produced in a control flask which had not been exposed to the light. He further reported that yeast was not destroyed even after exposure for fourteen hours; on the other hand, its activity was said to be increased owing to the bactericidal action of the rays on contaminating organisms injurious to alcoholic fermentation. *Feuer* and *Tanner* (1920), confirming the work of *Buchta*, reported that *yeasts* were only little more resistant to ultraviolet light than *bacteria*. This was confirmed by *Tanner* and *Ryder* (1923). They were unable to demonstrate greater fermentation after exposure of a contaminated *yeast* suspension to ultraviolet light. *Fazi* (1921) restated his position that *yeasts* could endure 12 hours exposure to ultraviolet light, while all of the *bacteria* were destroyed in a few minutes. If yeasts are able to endure such long exposure to an agent which has been found to harm all kinds of living protoplasm, their protoplasm differs markedly from that in other living organisms.

Lindner (1922) in general, confirmed the statements of *Fazi* concerning the greater yield of carbon dioxide after exposure of the substrate to the light. He did report, however, that exposure of stationary yeast cells for

100 minutes in a thin layer at a distance of 20 cm, was fatal. In a large quantity of liquid, however, where the cells were moving about, fermentation was increased. Beneficial effects of irradiation of beer were reported by *Fazi* (1922). *Fernbach* (1923) observed beneficial effects of ultraviolet light on the substrate before fermentation. He also reported good results from exposing *yeast* to the rays. He considered the ultraviolet light to be antiseptic. The rays were said to destroy the weaker cells and to activate the vigorous. The unfavorable results reported by some investigators were attributed to the use of degenerate yeast; such cells were said to be very sensitive to the rays. *Luers* and *Christoph* (1923) believed that the physiological condition of the *yeast* had little to do with its rate of destruction by ultraviolet light. Colloids and colored substances were said to considerably reduce the action of the rays. This may explain some of the results which have been reported on beer wort. *Söhngen* and *Coolhaas* (1923) could not confirm *Fazi*'s nor *Lindner*'s work. *Fazi* (1927) again reiterated his previous conclusions by reporting that glucose solutions prepared from distilled water previously exposed to ultraviolet light, fermented more rapidly when used immediately than similar solutions prepared with water not first irradiated.

Nadson and *Phillopov* (1928) and *Nadson* and *Stern* (1931) have made pertinent contributions. The former reported that direct exposure of *yeast* to ultraviolet light destroyed it. Any cells which were protected in any way were not affected. In an intermediate zone where the rays had fallen obliquely, growth was greatly stimulated as indicated by greater budding. *Nadson* and *Stern* reported ultraviolet rays to be approximately 120 times more effective than x-rays. Irradiated *yeast* cells were said to pass through three phases. In the first, the vacuoles swelled and the cells swelled. In the second, the protoplasm became less permeable and more granular, the fat droplets increasing in size and number. Finally, the volume of the vacuole and cell diminishes and the cell collapses and dies. *Nadson* and *Phillopov* reported that the cells were completely killed by exposure for one minute to ultraviolet rays. These investigators also showed that individual cells showed varying sensitivity to irradiation, young cells being more sensitive. *Owen* and *Mobley* (1933) more recently have purported to have confirmed the work of *Fazi*. Their technic consisted of allowing the material to be irradiated to run slowly from separatory funnel into a beaker directly in front of the light. The flow was so regulated that it would require one minute for the contents of the funnel to run into the beaker. This technic may have permitted reinoculation of the material. After the *yeast* had been irradiated, it was transferred to sterile wort in an *Erlenmeyer* flask fitted with an *Alwood* valve. The time of observation in their experiments was as long as 66 hours in some cases. Such a long time would permit new cells to be formed which had never been exposed to the light. Thus fermentation may not have been influenced either way by irradiation. The vigor of fermentation was followed by determining loss of weight and alcohol formation in the medium. Examination of the data presented in the tables shows many inconsistencies. In many cases, irradiated yeast formed no more carbon dioxide than ordinary yeast, and when a difference was observed, it was well within the range of experimental error which might have existed with the technic used. Quite often conclusions were reached that irradiation favored fermentation even though data in the tables showed the reverse. The *Alwood* procedure is merely a rough estimate of the amount

of carbon-dioxide produced and was not intended for refined methods of research. The percentage of alcohol produced was also irregular. In several cases more alcohol was formed in the control cultures which were not irradiated than in those cultures which were irradiated. The effects of irradiation on budding were also studied. More buds were reported on cells which had been exposed to ultraviolet light than on the unexposed. Data in the tables, however, are too inconsistent. It is questionable whether the conclusions reached by *Owen* and *Mobley* are justified by the experimental data reported in the paper. In several cases they reported more carbon dioxide from the controls than from exposed seed yeast in 24 hours. In other cases the differences are so small that they are insignificant and well within the range of experimental error.

Whether water and culture media may retain a germicidal property after exposure to ultraviolet light and the culture media made more susceptible to fermentation are interesting questions. *Coblenz* and *Fulton* (1924), *Bedford* (1927), *Norton* (1928), and *Walker* and *Pryer* (1921) have reported residual germicidal action of water after exposure to ultraviolet light. *Tanner* and *Geen* (1930), after working with 10 species of *bacteria* and three of *yeasts*, believed that the property, if it existed, varied with the species of microorganism.

As far as culture media are concerned, the evidence that irradiation improves the medium is questionable. *Woodrow*, *Bailey* and *Fulmer* (1928), and *Proks* (1933) reported that such exposed media were less suitable, the former investigator believing that a non-volatile toxic substance was formed when ultraviolet light acted on sucrose. Those who have reported reverse conclusions have based them, in many cases, on differences which are well within experimental error of the methods used or have used technic which may not have allowed penetration of the rays.

This review of literature indicates discordant results and conclusions. The reason for this situation is not easy to determine. It may be due in part to the species of yeast used and the conditions which obtained in the experiments. The methods used for determining the amount of carbon dioxide probably explain some discordant results.

Experimental.

In view of the differences of opinion on this question, it was decided to repeat and extend some of the experiments conducted in this laboratory several years ago. More refined methods have been developed which allow more reliable results. Four different modifications of technic were used as follows: (1) irradiation of dextrose broth cultures, (2) irradiation of aqueous suspensions of *yeast* before inoculation, (3) irradiation of fermenting cultures, (4) irradiation of dextrose broth before inoculation. Each experiment was carried out in duplicate and in some cases many times.

The source of ultraviolet light in this experiment was a *Cooper-Hewitt* lamp operated at 110 volts and 4 ampères (D. C.) at a distance of 25 cm. A fairly constant temperature was maintained during irradiation by means of an electric fan directed toward the light. A fermentometer described

by *Rahn* (1929) was used to determine the rate of fermentation. This method of measuring fermentation has the advantage of determining the rate for very short intervals of time immediately after exposure, thereby eliminating the possibility of fermentation by cells which were never exposed to the light. The gas pressure in the fermentometer was produced against mercury in the open arm. The record of the pressure was kept in millimeters of mercury. All irradiation was carried out in quartz flasks.

Saccharomyces cerevisiae and *Fleischmann*'s commercial pressed yeast were the principal yeasts used in this experiment.

Irradiation of Dextrose Broth Cultures.

Five ccm of a homogeneous suspension (made by placing a suspension on shaking machine for 10 minutes) of *S. cerevisiae* were placed in each of two quartz flasks containing 50 ccm of 1 % dextrose broth solution. Likewise, two ordinary glass flasks containing the same kind of a solution were inoculated with 5 ccm of the same homogeneous suspension of *S. cerevisiae*. Each flask was then connected to a fermentometer and the four flasks were placed under the ultraviolet light and irradiated at intervals over a period of 6 hours. The total time of irradiation was equal to 1 hour and 20 minutes. Of course only the culture within the quartz flasks were irradiated. The first reading was taken 13 hours after the flasks were connected to the fermentometer. The third .and last reading was taken 2 hours later or 15 hours after inoculation. The total pressure produced by the irradiated and non-irradiated cultures are given in Table I.

Table I.
Irradiated dextrose broth cultures of *Saccharomyces cerevisiae.*

Experiment	Time	Total pressure in millimeter of mercury	
		Irradiated culture	Non-irradiated culture
I	13 hrs.	53	179
II	15 „	38	219

This table shows that intermittent irradiation totaling 1 hr. and 20 min. over a period of 6 hours seriously inhibited fermentation. Much more carbon dioxide was formed in the non-irradiated control flask than was formed in the irradiated flask.

Fleischmann's commercial yeast was also used. This pressed yeast contains bacteria and would not give a pure culture fermentation. The procedure was the same as that for the culture of *S. cerevisiae* except that flasks were constantly agitated while under light. A series of 12 experiments were performed. The cultures were agitated and irradiated almost continuously during the experiment. *Fleischmann*'s

yeast produced sufficient gas so that the first reading could be made in about 3 hours after inoculation. From three to five readings were taken at intervals of 15 to 30 minutes in each experiment. Table II shows the total in each experiment. The data in this table again show more gas formation in the non-irradiated cultures.

Table II.
Irradiated dextrose broth cultures of *Fleischmann*'s commercial Yeast.

Experiment	Time	Total pressure in millimeter of mercury		Experiment	Time	Total pressure in millimeter of mercury	
		Irradiated culture	Non-irradiated culture			Irradiated culture	Non-irradiated culture
1	5 hrs.	137	167	7	4 hrs.	162	186
2	5 „	137	155	8	4 „	142	207
3	4 „	165	241	9	4.1 „	115	140
4	4 „	175	233	10	4.1 „	155	246
5	3.1 „	59	77	11	5 „	295	315
6	3.1 „	59	81	12	5 „	295	340

Irradiation of aqueous suspension of Yeast before inoculation.

Fazi reported that aqueous suspensions of yeast exposed to ultraviolet light had a tendency to accelerate fermentation when such suspensions were introduced into dextrose broth. Several experiments were carried out to test this conclusion. Ten ccm of distilled water were placed in each of four quartz flasks. Then 5 ccm of a homogeneous suspension of *Fleischmann*'s yeast were added to each flask. (*Fleischmann*'s commercial yeast was grown on dextrose agar slants and the even suspension made from the slants.) This suspension was then exposed to the ultraviolet light for 10 minutes. The suspension was continually agitated while under the light. After irradiation each suspension was added to a 100 ccm flask containing 50 ccm of a 1 % dextrose broth solution. Each of the four flasks were then connected to a fermentometer. Four other 100 ccm flasks containing 1 % dextrose broth solution were inoculated with 5 ccm of the same homogeneous suspension of non-irradiated yeast. This non-irradiated suspension was prepared in the same way, that is, 5 ccm of the suspension were placed in 10 ccm of distilled water and added to the 50 ccm of dextrose broth. This made each of the eight flasks contain 65 ccm of liquid substance. Each flask containing the non-irradiated culture was connected to a fermentometer to serve as controls. Table III shows the results of the experiment.

Table III.

Irradiated aqueous suspension of *Fleischmann's* commercial Yeast.

Time interval of reading	Pressure in millimeters of mercury							
	Flask number				Flask number			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	Irradiated				Non-irradiated			
24 hrs.	0	0	0	0	210	380	280	210
31 "	3	8	14	4	225	235	225	235

The first reading was taken 24 hours after the inoculation. A large amount of gas was formed by each of the four flasks containing the non-irradiated aqueous suspension while no gas was formed by the irradiated aqueous suspension This would seem to indicate that exposure to the rays had greatly harmed the yeasts. A few were able to rejuvenate themselves to form a little gas after 31 hours. The irradiated aqueous suspension did, however, show some gas formation at the end of 31 hours.

Irradiation of fermenting cultures.

Several experiments were performed to determine the effect of ultraviolet light on cultures after they had started to ferment. In this case 100 ccm flasks containing 50 ccm of a 1 % dextrose solution were inoculated with 5 ccm of an even suspension of *S. cerevisiae* and kept at room temperature for 36 hours, at which time the culture showed signs of fermentation. Half of the cultures were placed in quartz flasks and irradiated for 30 minutes. The other half of the total number of cultures was placed in ordinary glass flasks and subjected to the same conditions as those cultures in the quartz flasks, except, of course, they were not irradiated. Viable counts were made on the first 6 experiments, before and after irradiation. As has been found in all of the work, direct exposure of yeast suspension to ultraviolet light resulted in a marked decrease in numbers of viable cells. Starting with a suspension with too many cells to count, the number of viable cells would be reduced to 45,000, 90,000, 33,800, etc., depending on the period of exposure and whether the suspension was agitated occasionally during exposure.

Experiments with *Fleischmann's* pressed yeast gave similar results. The cultures were irradiated for 30 min. and the total time taken to produce the pressure given in Table IV varies from 2 to 5 hours. These results show that direct irradiation of a fermenting culture of yeast for 30 minutes greatly inhibits fermentation. The results also show that if the time of irradiation be decreased, the difference in the amount of

gas produced by irradiated and non-irradiated fermenting cultures becomes less. It was also noted that while irradiation delayed the production of gas at first, there was usually an increase in gas production by the irradiated culture with age. This may be explained by the fact that irradiation destroys many cells, but not all of them, and as the culture ages, an increase in number occurs by reproduction, these new organisms starting to produce gas as the age of the culture increases.

Table IV.

Fleischmann's commercial Yeast.

Experiment	Time required to produce pressure	Total pressure in millimeter of mercury		Experiment	Time required to produce pressure	Total pressure in millimeter of mercury	
		Irradiated culture	Non-irradiated culture			Irradiated culture	Non-irradiated culture
1	2 hrs.	68	180	5	4 hrs.	16	24
2	2 "	81	157	6	4 "	1	10
3	2 "	70	160	7	2 "	21	28
4	2 "	47	148	8	5 "	7	26

Irradiation of dextrose broth before inoculation.

In 1927 *Fazi* stated that glucose previously exposed to ultraviolet light fermented more rapidly when used immediately than similar solutions prepared from water not first irradiated. He also stated that the rate of fermentation was in no case as great as that of glucose solutions irradiated after their preparation. In the following experiment, 50 ccm of a 1 % dextrose solution were placed in each of four quartz flasks and irradiated for 5 hours. The solutions were then inoculated with 5 ccm of an even suspension of *S cerevisiae.* Each flask was immediately connected to a fermentometer. Similarly, four flasks containing 50 ccm of a 1 % dextrose solution which had not been irradiated were each inoculated with 5 ccm of the same suspension of *S. cerevisiae* as was used to inoculate the irradiated solution. The results are given in Table V. The results of such experiments seem to indicate that there is a tendency for dextrose media which have been irradiated for a long time to inhibit fermentation. The time of observation of this experiment was somewhat longer than in the others. It was prolonged to determine whether the difference would be regular.

The same type of experiment was tried using *Fleischmann's* pressed yeast instead of the regular stock culture of *S. cerevisiae*. The Table VI shows that 5 experiments gave results comparable to those obtained with the stock culture of *S. cerevisiae*, while 3 experiments give the opposite results in that the irradiated flasks showed more gas formation. The data are thus inconsistent.

Table V.

Dextrose broth irradiated for 5 hours before being inoculated with *Saccharomyces cerevisiae*

No of hrs elapsing between inoculation and first reading	Pressure in millimeters of mercury — Flask number 1	2	3	4	Aver
	Irradiated media.				
24 hrs	10	20	2	4	9
25 „	13	24	8	7	13
28 „	18	26	11	8	16
29 „	21	28	12	8	17
			Aver 11		
			Pressure released		
41 „	50	39	18	30	34
44 „	97	66	33	57	64
47 „	137	103	53	105	99
			Aver 36		
	Non-irradiated media				
24 hrs	22	6	7	25	15
25 „	26	6	13	32	19
28 „	33	12	16	40	25
29 „	35	16	18	46	29
			Aver 22		
			Pressure released		
41 „	60	58	48	85	63
44 „	110	90	76	122	99
47 „	187	140	118	178	130
			Aver 54		

Table VI

Fleischmann's yeast

Number of hours 1 % dextrose broth was irradiated — 5 hours

No of hrs elapsing between inoculation and first reading	Irradiated media Pressure in millimeters of mercury					Non-irradiated media Pressure in millimeters of mercury				
	Flask Number					Flask Number				
	1	2	3	4	Aver	1 a	2 a	3 a	4 a	Aver
	Irradiated					Non irradiated				
14 hrs	170	91	134	115	127	83	300	160	145	172
16 „	175	130	170	180	167	70	165	190	75	125

Conclusions.

1. *Yeasts* are destroyed when exposed directly to the effects of ultraviolet light

2. Irradiation of dextrose-broth cultures of fermenting yeasts in quartz apparatus for periods of time totaling 1 hour and 20 minutes seriously inhibited their fermenting ability.

3. Exposure of yeasts in aqueous suspension to ultraviolet light destroyed so many cells that no gas was formed in 24 hours; very small amounts were formed in 31 hours. The non-irradiated controls showed regular active gas formation.

4. Exposure of dextrose broth cultures to ultraviolet light, after fermentation had begun, greatly inhibited gas formation.

5. Dextrose broth irradiated for a long time before inoculation tended to ferment more slowly than the non-irradiated control media.

6. No observations were made to indicate that exposure of yeasts or media to ultraviolet before inoculation increased the amount of gas formed.

Bibliography.

W. B. Alwood, Bureau of Chem. U. S. Dept. Ag., Bull. III, 1908. — *T. H. B. Bedford*, Brit. J. of Exper. Pathol. 8, 437—441, 1927. — *L. Buchta*, Centralbl. f. Bakt. II, 41, 340—351, 1915. — *W. W. Coblenz* and *H. R. Fulton*, Scientific Papers, Bureau of Standards, No. 496, 1924. — *R. de Fazi*, Ann. Chim. Appl. 4, 301—329, 1915; Rev. in J. Inst. Brew. 22, 241, 1916. — *R. de Fazi* and *Remo*, Ann. Chim. Applicata 8, 93—101, 1917; Rev. in Chem. Abstr. 10, 950, 1917; 11, 683. — *Dieselben*, Giornale di Chim. ind. ed. applicata 4, 463, 1922; Rev. in J. Inst. Brew. 29, 255, 1923. — *R. de Fazi*, Atti accad. Lincei 5, 901—905, 1927; Rev. in Chem. Abstr. 21, 4013, 1927. — *A. Fernbach*, Ann. Brass et Dist. 22, 97—100, 1923; Rev. in J. Inst. Brew. 30, 65—66, 1921. — *B. Feuer* and *F. W. Tanner*, J. Ind. and Eng. Chem. 12, 740—741, 1920. — *P. Lindner*, Wochenschr. f. Brauerei. 39, 166—167, 1922; Rev. in J. Inst. Brew. 28, 820, 1922. — *W. Lohmann*, Influence of intense Light on the multiplication of Saccharomyces cerevisiae and other yeasts. Inaug. Dissert. Rostock 1896; Rev. in J. Fed. Inst. Brew. 3, 311, 1897. — *H. Luers* and *H. Christoph*, Centralbl. f. Bakt. II, 59, 8—13, 1923. — *G. Nadson* and *C. Stern*, Comp. Rend. Acad. Sci. 1931; Rev. in J. Inst. Brew. 37, 578, 1931. — *G. Nadson* and *G. Phillopov*, Comp. Rend. Soc. Biol. 98, 366—368, 1928. — *J. F. Norton*, Amer. J. Pub. Health. 18, 476—479, 1928. — *W. L. Owen* and *R. L. Mobley*, Centralbl. f. Bakt. II, 88, 273—286, 1933. — *J. Proks*, Lait. 13, 331—337, 1933; Rev. in Chem. Abstr. 27, 3233, 1933. — *Otto Rahn*, J. of Bact. 18, 199—205, 1929. — *A. W. Reinhard*, C. r. Soc. Biol. 89, 1923; Rev. in J. Inst. Brew. 89, 367. — *N. L. Söhngen* and *C. Coolhaas*, Wochenschr. f. Brauerei. 40, 187, 1923. — *F. W. Tanner* and *H. Geen*, Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 28, 291—293, 1930. — *F. W. Tanner* and *Earl Ryder*, Botan. Gaz. 75, 309—317, 1923. — *W. F. Walker* and *R. W. Pryer*, Amer. J. Publ. Health. 2, 703—706, 1921. — *J. W. Woodrow*, *A. C. Bailey* and *E. I. Fulmer*, Plant Physiology 2, 171—175, 1928.

Zur Frage nach der Wachstumsgrenze von Azotobacter chroococcum im alkalischen Bereich.

Von

Hans Wenzl (Wien).

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 17. März 1934.)

I. Problemstellung.

In den mannigfachen und eingehenden Studien, die über den weitverbreiteten *Azotobacter chroococcum* vorliegen, hat auch die Frage nach der Abhängigkeit des Wachstums und der Stickstoffbindung von der Wasserstoffionenkonzentration des Mediums eine entsprechende Berücksichtigung erfahren. Wir wissen daraus sehr genau, daß die Grenze für Wachstum und Vorkommen im sauren Bereich bei p_H 5,9 bis 6,0 liegt; *Fehèr* (1933) und *Janke* und Mitarbeiter (Arch. f. Mikrobiol. 5, 223, 1934) geben allerdings ein Vorkommen von *Azotobacter chroococcum* noch in Böden von p_H 4 bzw. 4,7 an.

Dieser p_H-Grenzwert gilt selbstverständlich nur bei einer ganz bestimmten Kombination der übrigen Wachstumsfaktoren, etwa in Lösungen mit allen nötigen Nährstoffen oder in guten lehmigen Ackerböden. In einer Arbeit über das Vorkommen von *Azotobacter chroococcum* in den Halophyten-, Hygrophyten- und Steppengesellschaften des östlichen Burgenlandes (Gebiet des Neusiedlersees) [*Wenzl*, 1934 a, b] konnte ich bei der lückenlosen Erfassung eines Gebietes von über 300 qkm — was nur unter Ausnutzung der Beziehungen zwischen Pflanzengesellschaften und Bodenmikroflora möglich war — aufzeigen, wie in einem Gebiet, das nach der Reaktion seiner Böden überall — mit Ausnahme der extremen Sodaböden — *Azotobacter* führen könnte, dieser dennoch vielfach fehlt, weil bestimmte andere Faktoren den Ansprüchen, die *Azotobacter* an den Boden stellt, nicht genügen. Es gelang aufzuzeigen, wie in manchen Teilen des Gebietes die untere p_H-Grenze für das Vorkommen von *Azotobacter* mit 7,5 bis 8 weit über dem absoluten Grenzwert von etwa 6 liegt, und wie bei einer günstigen Veränderung eines Faktors, etwa der Lagerungsdichte des Bodens und damit auch der Durchlüftung und der Wasserführung, sich auch die p_H-Grenze des Vorkommens von *Azotobacter* mit einem Wert von 7 der absoluten Grenze nähert, ohne daß sich das p_H der einzelnen Böden selbst verändert hat.

Weit weniger klar sehen wir in der Frage, wo die Wachstumsgrenze im alkalischen Bereich liegt. Da die hochalkalischen Sodaböden, in denen diese Frage Bedeutung erlangt, verhältnismäßig selten sind, hat dieses Problem noch wenig Beachtung erfahren.

Bei meinen Untersuchungen über das Vorkommen von *Azotobacter chroococcum* in den Halophytengesellschaften der Alkaliböden in der Umgebung des Neusiedlersees wurde ich notwendig auf die Frage geführt, bei welcher Wasserstoff- bzw. Hydroxylionenkonzentration die Grenze für Wachstum und Vorkommen von *Azotobacter chroococcum* liegt. Mit der Feststellung, daß *Azotobacter* noch in Böden vom p_H 9,4 bis 9,5 gefunden wurde, nicht aber in noch stärker alkalischen, daß weiter in Böden von p_H 9,2 bis 9,4 *Azotobacter* nicht immer vorhanden war, auch wenn nahe angrenzende Stellen mit einem etwas niedrigeren p_H noch *Azotobacter*-positiv waren, ist die gestellte Frage noch nicht erledigt. Das Problem der begrenzenden Faktoren in Alkaliböden ist sehr komplexer Natur. Zu der hohen Hydroxylionenkonzentration kommt die physikalische Beschaffenheit des Bodens, die die Vermutung nahelegt, daß die eigentümliche Struktur des Bodens begrenzend wirkt, nicht oder erst in zweiter Linie die hohe Hydroxylionenkonzentration. Im Zusammenhang mit der hohen Dispersität und der sehr dichten Lagerung der Bodenteilchen steht eine sehr langsame Wassernachleitung und eine äußerst schlechte Durchlüftung. Die extremen Salzböden sind auch meist nur spärlich bewachsen: der Humusgehalt ist zum Teil sehr gering, und abgestorbene Pflanzenteile, die als Betriebsstoffe dienen könnten, stehen nur in geringer Menge zur Verfügung. Nicht zu vernachlässigen ist endlich auch die Frage nach der Bedeutung der Salzkonzentration.

Lipman und *Sharp* (1912) fanden, daß 0,4 bis 0,5 % Na_2CO_3 das Wachstum von *Azotobacter* vollständig hemmt, was durch alle weiteren Untersuchungen bestätigt wurde. *Fred* und *Davenport* (1918) geben die obere Wachstumsgrenze für *Azotobacter chroococcum* mit p_H 8,8 an. Nach *Johnson* und *Lipman* (1922) liegt die Grenze für die Stickstoffbindung bei 9,0 bis 9,1. *Yamagata* und *Itano* (1923) stellten Versuche in *Ashby*-Lösung an unter Zusatz abgestufter Mengen NaOH. Noch bei einem Anfangs-p_H von 10,3 (12 ccm n/10 NaOH in 200 ccm Nährlösung) trat ein beträchtliches Wachstum ein, und zwar noch 80 % des bei einem Anfangs-p_H von 8 liegenden optimalen Wertes; das p_H der Lösungen war nach 96 Stunden allerdings von 10,3 auf 8 abgesunken. *Stapp* und *Ruschmann* (1925) geben die Wachstumsgrenze für *Azotobacter chroococcum* mit p_H 9,18 an. Zu den Versuchen wurden die *Sörensen*schen Phosphatpufferlösungen in Leitungswasser mit 2 % Mannit als Kohlenstoffquelle benutzt. Mit sekundärem Phosphat allein, mit dem in destilliertem Wasser ein p_H von 9,18 erreicht werden kann, trat noch Wachstum ein. Eine Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration wurde aber in diesen Versuchen nicht durchgeführt. Da weitere Lösungen von höherem p_H nicht geprüft wurden, ist es wohl nicht angängig, 9,18 als oberste p_H-Grenze anzugeben. Auf Möhrenagar gezogen, wuchs ein Stamm noch bei einem Zusatz von 0,3 % Na_2CO_3, ein anderer aber nur bei höchstens 0,15 %.

Fehér und *Bokor* (1931, 1932, 1933), die bei ihrer Beschäftigung mit der Mikrobiologie der Alkaliböden auch auf die praktisch wichtige Frage nach der Abhängigkeit des *Azotobacter*wachstums vom p_H und der Soda-

konzentration geführt wurden, fanden bei Versuchen mit Reinkulturen die Wachstumsgrenze in Nährlösungen bei 0,15 % Na_2CO_3. Leider sind die Bodenuntersuchungen der beiden Autoren zur Klärung der Frage, bis zu welcher Soda- bzw. Hydroxylionenkonzentration *Azotobacter* im Boden fortzukommen vermag, nur verhältnismäßig wenig auszuwerten. Die Zahl der im natürlichen Zustande belassenen, in die Untersuchung einbezogenen Alkaliböden ist verhältnismäßig gering, kaum 20. Zwischen Sodagehalt, p_H, Bodenvegetation und dem Vorkommen oder Fehlen von *Azotobacter* sind auch bei aufmerksamster Prüfung der mitgeteilten Ergebnisse keine gesetzmäßigen Zusammenhänge festzustellen, im Gegensatz zu den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen am Neusiedlersee. Auffallend ist besonders, daß Böden mit geringem Sodagehalt hohe p_H-Werte und solche mit hohem Sodagehalt verhältnismäßig geringe p_H-Werte aufweisen. Zur teilweisen Erklärung kann darauf hingewiesen werden, daß die p_H-Bestimmungen mit der Chinhydronelektrode ausgeführt wurden, die aber in alkalischen Lösungen grundsätzlich nicht angewendet werden darf (*Michaelis*, 1933). Weitere Versuche sollten Aufschluß über das Vorkommen und vor allem über die N-Bindung von *Azotobacter chroococcum* in den Alkaliböden geben: In *Neubauer*-Schalen wurden mit Mannit oder Lactose versehene Erdproben zum Teil mit Reinkulturen von *Azotobacter*, zum Teil mit Bodensuspension aus einem an *Azotobacter* reichen Boden beimpft und die N-Zunahme gegenüber den unbeimpften Kontrollen bestimmt. In einem (dem einzigen zur Untersuchung gelangten naturbelassenen, nicht meliorierten) Salzboden (Solontschak mit 2,2 % $CaCO_3$) war durch die Beimpfung keine Zunahme des N-Gehaltes zu erreichen. Da andere (meliorierte) Böden durch die Beimpfung eine Anreicherung an Stickstoff erfuhren, wird geschlossen, daß im natürlichen Boden, auch wenn er kalkhaltig ist, schon bei 0,02 % Na_2CO_3 die N-Bindung sistiert wird und *Azotobacter*, wenn überhaupt vorhanden, nicht stickstoff-autotroph, sondern -heterotroph lebt. Dem aber steht entgegen, daß — allerdings mit Kalk meliorierte — Böden mit einem etwas höheren p_H (8,75) bei einem zugleich höheren Sodagehalt (0,026 %) bei der Beimpfung mit *Azotobacter* eine N-Bindung aufwiesen. Eine weitere — mit Kalk und Stallmist behandelte — Bodenprobe mit einem (wahrscheinlich) nur ganz wenig niedrigeren Sodagehalt (0,018 %, p_H 8,8) — an anderen Stellen wird für den gleichen Boden allerdings ein Sodagehalt von 0,18 bzw. 1,8 % angegeben — zeigte eine Erhöhung des N-Gehaltes auf das Dreifache. Weiter ist zu bemerken, daß Versuche mit nicht meliorierten Solonetzböden bei einem Sodagehalt, der die angegebene Grenze wesentlich übersteigt, noch eine deutliche N-Bindung ergaben. Die von *Bokor* und *Fehér* gezogenen Schlußfolgerungen müssen also leider auf Grund eines sorgfältigen Vergleichs ihrer eigenen Angaben zumindest als unbewiesen angesehen werden.

II. Untersuchungsergebnisse.

Eigene Versuche mit Roh- und Reinkulturen von *Azotobacter chroococcum* bestätigen, daß die Wachstumsgrenze zwischen 0,1 und 0,2 % Soda liegt, für einen Stamm von *Azotobacter chroococcum* allerdings, der aus gewöhnlicher kalkhaltiger Gartenerde von p_H 7,6 stammt. Vermutlich wurden auch in allen genannten Arbeiten *Azotobacter*-Stämme aus gewöhnlicher Ackererde und nicht solche aus Alkaliböden verwendet.

Angaben darüber fehlen. In der Frage nach dem verschiedenen Verhalten einzelner Stämme sind die Angaben von *Stapp* und *Ruschmann* (1925) sehr bemerkenswert (vgl. S. 359). Die Vermutung, daß *Azotobacter*-Stämme aus Alkaliböden an höhere Sodakonzentrationen angepaßt sind, ist naheliegend, bedarf aber erst der Bestätigung.

Die zu den Versuchen verwendete Nährlösung hatte die folgende Zusammensetzung: 1000 g Leitungswasser, 20 g Mannit, 0,75 g K_2HPO_4, 0,3 g $MgSO_4$, 0,2 g NaCl, 0,02 g $FeSO_4$, 0,02 g $Al_2(SO_4)_3$ und 5 g $CaCO_3$. Je 40 ccm dieser Nährlösung in 250 ccm-*Erlenmeyer*-Kolben wurden beimpft und bei 25 bis 26° im Thermostaten gehalten. Jeder Versuch wurde dreifach durchgeführt.

Zu den Untersuchungen wurde einerseits eine Reinkultur von *Azotobacter chroococcum* verwendet, andererseits eine Rohkultur in Form von 0,01 g Ackererde, die je Gramm etwa 40000 *Azotobacter*keime enthielt. In diesen Rohkulturen war das Wachstum viel üppiger als in den Reinkulturen.

1. Das Wachstum von Azotobacter chroococcum in Abhängigkeit von der Sodakonzentration.

Eine erste Versuchsreihe, die die Natriumcarbonatkonzentrationen von 0,4 bis 0,01 % umfaßte (alle Angaben sind auf wasserfreies Na_2CO_3 bezogen), zeigte, daß sich eine Reinkultur in ihrem Wachstum gegen Soda ebenso verhält wie eine Rohkultur bzw. Mischkultur aus natürlicher Ackererde. In der Versuchsreihe mit der *Azotobacter*-Reinkultur war zwischen der sodafreien Kontrolle, 0,01, 0,025 und 0,05 % Natriumcarbonat nach 7 Tagen kaum ein Unterschied (0,05 % war nur ganz wenig schwächer), 0,1 % hemmte bereits deutlich das Wachstum, mit 0,2 % war es sistiert. Die drei Parallelversuche zeigten eine völlige Übereinstimmung. Etwas weniger gleichmäßig war das Wachstum in den drei Kolben mit den Rohkulturen. In der Tabelle sind die Durchschnittswerte angeführt. 0,1 und auch schon 0,05 % hemmte, wie aus dem Vergleich mit den sodafreien Kontrollen hervorgeht, bereits deutlich die *Azotobacter*-Entwicklung in der Rohkultur. 0,2 % verhinderte wie in den Reinkulturen jedes Wachstum; auch nach 3 Wochen war die Lösung vollkommen klar geblieben. (Die Kontrolle wurde selbstverständlich immer auch mikroskopisch durchgeführt.) Eine weitere Versuchsreihe mit Natriumhumatzusatz brachte eine Bestätigung der gewonnenen Ergebnisse.

Die hochwirksame Humuslösung war aus Lauberde hergestellt. Diese wurde mit verdünnter Salzsäure gereinigt, und die Humusstoffe wurden mit 10 % NaOH in Lösung gebracht. Aus der durch Zentrifugieren geklärten Lösung wurden die Humussäuren durch Salzsäure ausgefällt. Nach dem Waschen wurden sie mit verdünnter Lauge wieder in Lösung gebracht und mit Hilfe von Lackmuspapier auf eine schwach alkalische Reaktion eingestellt. Der Humuszusatz zur Nährlösung war so bemessen, daß diese noch in dünner Schicht (etwa 1 ccm) eine tiefbraune Färbung hatte.

konzentration geführt wurden, fanden bei Versuchen mit Reinkulturen die Wachstumsgrenze in Nährlösungen bei 0,15 % Na_2CO_3. Leider sind die Bodenuntersuchungen der beiden Autoren zur Klärung der Frage, bis zu welcher Soda- bzw. Hydroxylionenkonzentration *Azotobacter* im Boden fortzukommen vermag, nur verhältnismäßig wenig auszuwerten. Die Zahl der im natürlichen Zustande belassenen, in die Untersuchung einbezogenen Alkaliböden ist verhältnismäßig gering, kaum 20. Zwischen Sodagehalt, p_H, Bodenvegetation und dem Vorkommen oder Fehlen von *Azotobacter* sind auch bei aufmerksamster Prüfung der mitgeteilten Ergebnisse keine gesetzmäßigen Zusammenhänge festzustellen, im Gegensatz zu den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen am Neusiedlersee. Auffallend ist besonders, daß Böden mit geringem Sodagehalt hohe p_H-Werte und solche mit hohem Sodagehalt verhältnismäßig geringe p_H-Werte aufweisen. Zur teilweisen Erklärung kann darauf hingewiesen werden, daß die p_H-Bestimmungen mit der Chinhydronelektrode ausgeführt wurden, die aber in alkalischen Lösungen grundsätzlich nicht angewendet werden darf (*Michaelis*, 1933). Weitere Versuche sollten Aufschluß über das Vorkommen und vor allem über die N-Bindung von *Azotobacter chroococcum* in den Alkaliböden geben: In *Neubauer*-Schalen wurden mit Mannit oder Lactose versehene Erdproben zum Teil mit Reinkulturen von *Azotobacter*, zum Teil mit Bodensuspension aus einem an *Azotobacter* reichen Boden beimpft und die N-Zunahme gegenüber den unbeimpften Kontrollen bestimmt. In einem (dem einzigen zur Untersuchung gelangten naturbelassenen, nicht meliorierten) Salzboden (Solontschak mit 2,2 % $CaCO_3$) war durch die Beimpfung keine Zunahme des N-Gehaltes zu erreichen. Da andere (meliorierte) Böden durch die Beimpfung eine Anreicherung an Stickstoff erfuhren, wird geschlossen, daß im natürlichen Boden, auch wenn er kalkhaltig ist, schon bei 0,02 % Na_2CO_3 die N-Bindung sistiert wird und *Azotobacter*, wenn überhaupt vorhanden, nicht stickstoff-autotroph, sondern -heterotroph lebt. Dem aber steht entgegen, daß — allerdings mit Kalk meliorierte — Böden mit einem etwas höheren p_H (8,75) bei einem zugleich höheren Sodagehalt (0,026 %) bei der Beimpfung mit *Azotobacter* eine N-Bindung aufwiesen. Eine weitere — mit Kalk und Stallmist behandelte — Bodenprobe mit einem (wahrscheinlich) nur ganz wenig niedrigeren Sodagehalt (0,018 %, p_H 8,8) — an anderen Stellen wird für den gleichen Boden allerdings ein Sodagehalt von 0,18 bzw. 1,8 % angegeben — zeigte eine Erhöhung des N-Gehaltes auf das Dreifache. Weiter ist zu bemerken, daß Versuche mit nicht meliorierten Solonetzböden bei einem Sodagehalt, der die angegebene Grenze wesentlich übersteigt, noch eine deutliche N-Bindung ergaben. Die von *Bokor* und *Fehér* gezogenen Schlußfolgerungen müssen also leider auf Grund eines sorgfältigen Vergleichs ihrer eigenen Angaben zumindest als unbewiesen angesehen werden.

II. Untersuchungsergebnisse.

Eigene Versuche mit Roh- und Reinkulturen von *Azotobacter chroococcum* bestätigen, daß die Wachstumsgrenze zwischen 0,1 und 0,2 % Soda liegt, für einen Stamm von *Azotobacter chroococcum* allerdings, der aus gewöhnlicher kalkhaltiger Gartenerde von p_H 7,6 stammt. Vermutlich wurden auch in allen genannten Arbeiten *Azotobacter*-Stämme aus gewöhnlicher Ackererde und nicht solche aus Alkaliböden verwendet.

Angaben darüber fehlen. In der Frage nach dem verschiedenen Verhalten einzelner Stämme sind die Angaben von *Stapp* und *Ruschmann* (1925) sehr bemerkenswert (vgl. S. 359). Die Vermutung, daß *Azotobacter*-Stämme aus Alkaliböden an höhere Sodakonzentrationen angepaßt sind, ist naheliegend, bedarf aber erst der Bestätigung.

Die zu den Versuchen verwendete Nährlösung hatte die folgende Zusammensetzung: 1000 g Leitungswasser, 20 g Mannit, 0,75 g K_2HPO_4, 0,3 g $MgSO_4$, 0,2 g NaCl, 0,02 g $FeSO_4$, 0,02 g $Al_2(SO_4)_3$ und 5 g $CaCO_3$. Je 40 ccm dieser Nährlösung in 250 ccm-*Erlenmeyer*-Kolben wurden beimpft und bei 25 bis 26° im Thermostaten gehalten. Jeder Versuch wurde dreifach durchgeführt.

Zu den Untersuchungen wurde einerseits eine Reinkultur von *Azotobacter chroococcum* verwendet, andererseits eine Rohkultur in Form von 0,01 g Ackererde, die je Gramm etwa 40000 *Azotobacter*keime enthielt. In diesen Rohkulturen war das Wachstum viel üppiger als in den Reinkulturen.

1. Das Wachstum von Azotobacter chroococcum in Abhängigkeit von der Sodakonzentration.

Eine erste Versuchsreihe, die die Natriumcarbonatkonzentrationen von 0,4 bis 0,01 % umfaßte (alle Angaben sind auf wasserfreies Na_2CO_3 bezogen), zeigte, daß sich eine Reinkultur in ihrem Wachstum gegen Soda ebenso verhält wie eine Rohkultur bzw. Mischkultur aus natürlicher Ackererde. In der Versuchsreihe mit der *Azotobacter*-Reinkultur war zwischen der sodafreien Kontrolle, 0,01, 0,025 und 0,05 % Natriumcarbonat nach 7 Tagen kaum ein Unterschied (0,05 % war nur ganz wenig schwächer), 0,1 % hemmte bereits deutlich das Wachstum, mit 0,2 % war es sistiert. Die drei Parallelversuche zeigten eine völlige Übereinstimmung. Etwas weniger gleichmäßig war das Wachstum in den drei Kolben mit den Rohkulturen. In der Tabelle sind die Durchschnittswerte angeführt. 0,1 und auch schon 0,05 % hemmte, wie aus dem Vergleich mit den sodafreien Kontrollen hervorgeht, bereits deutlich die *Azotobacter*-Entwicklung in der Rohkultur. 0,2 % verhinderte wie in den Reinkulturen jedes Wachstum; auch nach 3 Wochen war die Lösung vollkommen klar geblieben. (Die Kontrolle wurde selbstverständlich immer auch mikroskopisch durchgeführt.) Eine weitere Versuchsreihe mit Natriumhumatzusatz brachte eine Bestätigung der gewonnenen Ergebnisse.

Die hochwirksame Humuslösung war aus Lauberde hergestellt. Diese wurde mit verdünnter Salzsäure gereinigt, und die Humusstoffe wurden mit 10 % *NaOH in Lösung gebracht*. *Aus der durch* Zentrifugieren geklärten Lösung wurden die Humussäuren durch Salzsäure ausgefällt. Nach dem Waschen wurden sie mit verdünnter Lauge wieder in Lösung gebracht und mit Hilfe von Lackmuspapier auf eine schwach alkalische Reaktion eingestellt. Der Humuszusatz zur Nährlösung war so bemessen, daß diese noch in dünner Schicht (etwa 1 ccm) eine tiefbraune Färbung hatte.

2. *Das Wachstum von Azotobacter chroococcum in Abhängigkeit von der Wasserstoffionen-Konzentration.*

Was besagen nun diese Versuche über die Wachstumsgrenze von *Azotobacter* im alkalischen Bereich? Die zu Beginn der Versuche gemessene Wasserstoffionen-Konzentration der Nährlösung mit verschieden hohen Natriumcarbonatzusätzen gibt noch nicht die p_H-Grenze für das Wachstum an. Denn beim Stehen an der Luft geht die Natriumcarbonatlösung durch Aufnahme von Kohlendioxyd in Natriumbicarbonat über, oder, richtiger, es bildet sich ein Gleichgewicht Carbonat-Bicarbonat aus. Damit sinkt auch der anfänglich sehr hohe p_H-Wert mit fortschreitender Kohlensäureaufnahme immer mehr ab, bis endlich ein von der anfänglichen Sodakonzentration abhängiger konstanter Endwert erreicht ist. Bei Verwendung von geringen Schichtdicken (40 ccm Flüssigkeit in 250 ccm-*Erlenmeyer*-Kolben) ist nach etwa einer Woche der Ausgleich eingetreten. Der Versuch ergab nun, daß es völlig gleichgültig ist, ob die mit Natriumcarbonat versetzte Nährlösung sofort beimpft wird oder erst nach 10 Tagen, nachdem bereits ein konstanter p_H-Wert erreicht ist; die hemmende Grenzkonzentration erleidet keine Veränderung, zumindest keine beträchtliche, die aus den nur ziemlich grob abgestuften Versuchen (etwa 1 : 2) ersichtlich wäre. Das Ergebnis war mit Roh- und Reinkulturen, sowie mit oder ohne Humus das gleiche. Wenn auch die Grenzkonzentration keine wesentliche Veränderung erfährt, so ist doch bemerkenswert, daß in der Reihe, die erst nach zehntägigem Stehen beimpft wurde, bei 0,1 % Natriumcarbonat eine sehr gute Entwicklung von *Azotobacter* eingetreten ist,

Tabelle I.

40 ccm Nahrlosung und 2 ccm Natriumcarbonatlosung in 250-ccm-*Erlenmeyer*-Kolben.

a) Mit 1 ccm Suspension einer Reinkultur von *Azotobacter* beimpft.
b) Mit 1 ccm Erdsuspension (0,01 g) beimpft.
c) Reinkultur mit Humuszusatz.
d) Erst 10 Tage nach Herstellung der Lösungen mit 1 ccm Erdsuspension beimpft.

Na_2CO_3-Konz. in %	Reinkultur	Rohkultur	Reinkultur mit Humus	Rohkultur nach 10 Tagen beimpft
0 (Kontrolle)	..	.... + +	... —	.... + — + +
0,01	..	.... + +	....	.... + +
0,025	..	.... + +	....	.... + +
0,05	..	... + — + +	... —	.... + +
0,1	.	... + .	.. — ...	.... + — + +
0,2	0	0	0	0
0,4	0	0	0	0

. bis ....: Intensität der Trübung der Nährlösung. + bis + + + +: Stärke der Deckenbildung. (+ + + +: sehr starke runzelige Decke.)

während in den sofort nach dem Herstellen der Lösung beimpften Parallelen die Entwicklung von *Azotobacter* bei dieser Konzentration deutlich schwächer war.

Bemerkenswert ist auch die vielfach beobachtete Erscheinung, daß Kulturen mit 0,01 und 0,025 % Natriumcarbonat die sodafreien Parallelkulturen im Wachstum etwas, wenn auch nicht viel, übertrafen.

Parallellaufende Bestimmungen der Wasserstoffionenkonzentration lassen eine weitere Auswertung der Versuche zu.

Die Bestimmungen wurden elektrometrisch mit der Wasserstoffelektrode ausgeführt, so daß, was besonders betont sei, auch die Werte für die stark alkalischen Lösungen vollkommen verläßlich sind. Die angegebenen Werte sind Durchschnittswerte aus je drei Bestimmungen (drei Gefäße), die untereinander sehr gut übereinstimmten.

Die Nährlösung mit 0,5 % Natriumcarbonat hat ein Anfangs-p_H von 11,05, mit 0,1 % noch von 10,35; dann fallt das p_H sehr schnell ab: mit 0,025 % Sodazusatz hat die Nährlösung noch ein Anfangs-p_H von 9,75, mit 0,01 % nur mehr 8,8 bis 8,9 (Abb. 1). Nach 9 Tagen (Lösungen in flacher Schicht in *Erlenmeyer*-Kolben) war das p_H sehr stark abgesunken: 0,5 %: 9,60; 0,25 %: 9,35; 0,1 %: 9,0; 0,05 %: 8,70.

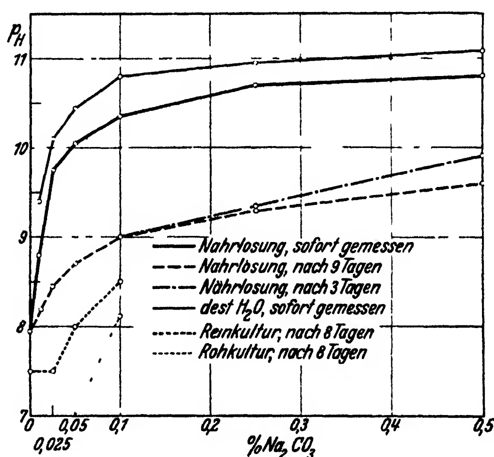


Abb. 1.
Wasserstoffionenkonzentration in Abhängigkeit vom Na_2CO_3-Gehalt.

In der graphischen Darstellung sind auch die Anfangs-p_H-Werte der entsprechenden Natriumcarbonatkonzentrationen in reinem destilliertem Wasser wiedergegeben. Sie liegen durchweg etwas höher als die der Nährlösung. Weiter ist zu ersehen, daß das p_H der Lösung unter den Versuchsbedingungen, zumindest in den in Betracht kommenden Konzentrationsstufen bis 0,2 % nach 9 Tagen einen konstanten Wert erreicht hat. Nach dieser Zeit ist bei 0,1 % kein Unterschied mehr gegenüber dem nach nur 3 Tagen gemessenen Wert; bei 0,25 % beträgt der Unterschied nur mehr 0,05 Einheiten. Wie die weitere Prüfung zeigte, war mit p_H 9,35 für 0,25 % Natriumcarbonat ein konstanter Wert erreicht, für 0,5 % liegt er bei 9,5 bis 9,55. Wo die Lösungen erst nach zehntägigem Stehen beimpft wurden, war bereits ein konstantes p_H erreicht. In einer Lösung vom End-p_H 9

(0,1 % Na_2CO_3) zeigte *Azotobacter* ein, wenn auch gegenüber den niedrigeren Sodakonzentrationen gehemmtes, so doch noch ziemlich intensives Wachstum. Durch 0,2 % Natriumcarbonat (End-p_H 9,25) ist sein Wachstum bereits völlig unterbunden. Der Grenzwert für das Wachstum von *Azotobacter* liegt also zwischen p_H 9 und 9,25, genauer: zwischen 9,1 und 9,2. Daß der Grenzwert über 9,1 liegt, wenn auch vielleicht nur knapp darüber, ist deshalb höchst wahrscheinlich, weil bei p_H 9 das Wachstum, besonders in den Rohkulturen, noch recht intensiv ist. Da schon nach 3 Tagen in den Kolben mit 0,1 % Natriumcarbonat ein p_H von 9 erreicht ist, tritt auch in den sofort beimpften Kolben, die anfangs ein viel höheres p_H haben (über 10), Wachstum ein, wenn auch etwas verspätet. Ein Medium von p_H 10,3 bis 10,4 wirkt also, zumindest wenn es sich nicht um allzu lange Zeit handelt, auf *Azotobacter* nicht abtötend, sondern nur wachstumshemmend. p_H-Messungen in den mit *Azotobacter* beimpften Kolben zeigen, daß nach 7 bis 8 Tagen die Nahrlösung mit 0,1 % Natriumcarbonat ein p_H von 8,5 (Reinkultur) bzw. 8,1 (Rohkultur) angenommen hat. Die Wasserstoffionenkonzentration war also beträchtlich höher als die der unbeimpften Lösung, die ein End-p_H von 9 aufwies. In den gut angewachsenen Kolben mit den geringeren Natriumcarbonatkonzentrationen betrug das p_H der Reinkulturen 7,5 bis 8, das der Rohkulturen 6,5 bis 7.

Mit der Feststellung der Wachstumsgrenze von p_H 9,1 bis 9,2 für den vorliegenden, aus guter Gartenerde isolierten Stamm von *Azotobacter chroococcum* erhebt sich die Frage nach dem Verhalten der in alkalische Salzböden vordringenden *Azotobacter*-Stämme. Nachdem in Sodaböden *Azotobacter* noch bis zu p_H 9,5 festgestellt werden konnte, liegt die p_H-Grenze jedenfalls höher. Fur entsprechende Laboratoriumsversuche mit Stammen aus Alkaliböden, die zur Analyse der das Vorkommen in den Alkaliböden begrenzenden Faktoren von Interesse sein müßten, fehlten leider Zeit und Möglichkeit.

III. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die Grenze fur das Wachstum eines aus Ackererde isolierten Stammes von *Azotobacter chroococcum* liegt zwischen p_H 9,1 und 9,2. Rohkulturen zeigen dasselbe Verhalten wie Reinkulturen.

2. Für *Azotobacter*-Stämme aus sodahaltigen Salzböden liegt der entsprechende p_H-Grenzwert zumindest um 0,3 bis 0,4 Einheiten höher.

3. Das Wachstum des untersuchten Stammes wurde durch einen Zusatz von 0,2 % Natriumcarbonat zur Nährlösung bereits vollständig gehemmt.

4. Während Phosphatpuffer zur Untersuchung der Frage nach der Wachstumsgrenze von *Azotobacter* im alkalischen Bereich nicht aus-

reichen und andere Puffergemische (etwa Borat-Lauge) wegen ihrer Giftigkeit nicht in Frage kommen, waren Natriumcarbonat-Bicarbonatlösungen ausgezeichnet brauchbar.

Literatur.

R. Bokor, Erdeszeti Kisérletek **34**, 1, 1932 (ungarisch mit deutscher Zusammenfassung). — *Derselbe*, Die Mikrobiologie der Szik-(Salz- oder Alkali-)Boden mit besonderer Berücksichtigung ihrer Fruchtbarmachung. In *D. Fehér*, Untersuchungen uber die Mikrobiologie des Waldbodens, S. 221, Berlin 1933. — *D. Fehér* u. *R. Bokor*, Math.-naturw. Ber. aus Ungarn **38**, 80, 1931. — *E. B. Fred* u. *A. Davenport*, J. agric. Res. **14**, 317, 1918. — *H. W. Johnson* u. *C. B. Lipman*, Univ. California Publ. Agric. Sci. **4**, 397, 1922. — *C. B. Lipman* u. *L. T. Sharp*, Centralbl. f. Bakt. II, **35**, 647, 1912. — *L. Michaelis*, Die Messung der Wasserstoffionenkonzentration in *G. Klein*, Handb. d. Pflanzenanalyse **1**, 447, 1933. — *C. Stapp* u. *G. Ruschmann*, Arbeiten a. d. Biol. Reichsanst. **13**, 305, 1925. — *H. Wenzl*, a) Beih. z. Bot. Centralbl., Abt. A., **52**, 73, 1934; b) Centralbl. f. Bakt. II, **89**, 353, 1934. — *A. Yamagata* u. *A. Itano*, J. Bact. **8**, 521, 1923.

(Aus der Forschungsstelle für landwirtschaftliche Gärungen in Berlin.)

Die auf grünen Pflanzen vorkommenden Coli- und coliähnlichen Bakterien und ihre Eigenschaften unter verschiedenen Züchtungsbedingungen.

Von

G. Ruschmann (jetzt Landsberg-Warthe) und W. Meyer.

(Eingegangen am 20. März 1934.)

Bei den Untersuchungen älterer Autoren über das Verhalten von Bakterien der *Coli-Aerogenes*-Gruppe gegenüber verschiedenen Züchtungsbedingungen handelt es sich in der weitaus größten Zahl der Falle um solche Keime, die aus dem Darm von Tieren und Menschen oder aus Wasser isoliert worden sind. Nur vereinzelt finden sich Angaben über Organismen dieser Gruppe, die von grünen Pflanzen stammen. Bei der immer stärkeren Verbreitung des Einsäuerns von leicht verderblichem grunem Pflanzenmaterial zwecks Versorgung unserer landwirtschaftlichen Nutztiere mit wirtschaftseigenem Futter ist es von größter Bedeutung, die Eigenschaften der auf diesen Pflanzen vorkommenden *Coli-Aerogenes*-Arten genauer zu untersuchen, um auf Grund der Kenntnis ihrer Lebensbedingungen imstande zu sein, diese schädliche Flora zu unterdrücken und so eine sichere und gute Konservierung des Futters zu erreichen.

Zunächst war festzustellen, was fur Arten und Varietäten der erwähnten Bakteriengruppe auf den Pflanzen vorkommen, und wie sich diese Arten unter dem Einfluß verschiedener Faktoren verhalten. Um auf diese Fragen eingehen zu können, züchteten wir von verschiedenem Pflanzenmaterial zahlreiche Organismen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe.

A. Die auf den Pflanzen vorkommenden Coli- und coliähnlichen Arten.

I. Herkunft und Reinzüchtung der Stämme.

Die Stämme, mit denen später auch Versuche der verschiedensten Art angestellt wurden, stammten teils von frischem Grünfutter (gewöhnlichem Gras, Rieselfeldergras und Mais), zum Teil von demselben Material, das zur Einsäuerung in Behälter gepreßt und darin ein bis mehrere Tage aufbewahrt worden war. In einigen Fällen wurde es entsprechend dem in der Praxis angewendeten Ansäuerungsverfahren mit anorganischen Säuren behandelt.

Bei dem eingelegten Futter schwankten die p_H-Werte zwischen 6,8 und 4,1. Von dem Untersuchungsmaterial wurden in üblicher Weise Verdünnungen mit sterilem Leitungswasser in Potenzen von 10 angelegt und davon Bouillonagar- und Würzegelatineplatten gegossen. Die Bouillonagar-

platten wurden 5 Tage bei 30°, die Würzegelatineplatten 7 Tage bei Zimmertemperatur aufgestellt.

Für die vorläufige Auswahl der *Coli-* und *coli*ähnlichen Stämme waren die Form und Farbe der Kolonien und bei den Gelatineplatten außerdem ihre Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, maßgebend. Von den ausgewählten Kolonien wurde zunächst in Bouillon abgeimpft. Diese Kultur diente als Ausgangspunkt für drei aufeinanderfolgende Plattengußpassagen, die die Reinheit des Stammes gewährleisteten. Hierbei traten bei den einzelnen Stämmen immer dieselben Kolonieformen auf den Platten auf. Eine Spaltung in *R-* und *S*-Formen, wie sie unter anderem *I. W. Nungester* und *S. A. Anderson* (50) festgestellt haben, ist in keinem Fall beobachtet worden. Die auf diese Weise erhaltenen reinen Stämme wurden weiterhin auf Bouillonschrägagar fortgezüchtet..

Im ganzen sind nach dieser Methode 100 Stämme isoliert worden, von denen 32 von frischen Pflanzen stammten oder von solchen, die im Höchstfall einen Tag lang eingepreßt gelagert und dabei ihr p_H nicht wesentlich verändert hatten. Weiterhin wurden alle Stämme auf *Gram*-Färbbarkeit, Katalase- und Indolbildung, Fähigkeit zur Milchzucker- und Traubenzuckervergärung und zur Verflüssigung von Gelatine sowie auf ihr Verhalten in Milch und auf Kartoffeln geprüft. Zur Ergänzung dienten morphologische Untersuchungen. Zu allen Arbeiten wurden 24 Stunden alte Schrägagarkulturen verwandt.

II. Eigenschaften und Bestimmung der Coli-Aerogenes-Arten.

Untersuchung der Kulturen nach K. B. Lehmann und R. O. Neumann. — Der Bestimmung der verschiedenen *Coli-* und *coli*ähnlichen Arten wurde die Einteilung von *K. B. Lehmann* und *R. O. Neumann* (37) zugrunde gelegt. Von den isolierten Stämmen wurden diejenigen zu Gruppen zusammengestellt, die ungefähr gleiche Eigenschaften zeigten, und ein oder mehrere Vertreter aus diesen Gruppen ausgewählt, die als Material für die weiteren Untersuchungen dienten. Als Vergleichsorganismus ist der in der Forschungsstelle für landwirtschaftliche Gärungen vorhandene typische *Coli*-Stamm „*Coli Haar*" herangezogen worden, der aus dem *Robert Koch*-Institut stammt und dort aus menschlichen Fäzes isoliert wurde.

Das Ergebnis der Prüfungen ist aus der beigegebenen Tabelle I zu ersehen, aus der zunächst hervorgeht, daß sich die gefundenen 100 Stämme in acht Gruppen *coli*ähnlicher Bakterien zusammenfassen ließen. Schon *I. E. Minkewitsch* (43), *K. Pesch* (52), *H. Maulhardt* (41), *R. Kopp* (31), *M. Löweneck* (40) und *H. Geilinger* (14) wiesen auf die Mannigfaltigkeit der Formen und Arten innerhalb der *Coli*-Gruppe hin.

Unter den 32 von frischen oder einen Tag lagernden Pflanzen isolierten Stämmen befanden sich vier Indolbildner (Nr. 26, 30, 300 und 302), die alle Gelatine verflüssigten und auf Bouillonagar gelbbräunliche Kolonien bildeten. Unter den übrigen 68 Stämmen, die einem Einfluß

Tabelle I. Übersicht über die von grünen Pflanzen

Stamm	Herkunft	Farbe der Kolonien auf Bouillon-agar	Wachstum auf Kartoffeln	Beweglichkeit	Gramfärbbarkeit	Katalaseprobe	Gelatineverflüssigung (nach Tagen)	Indolbildung	Milchzuckerzersetzung			
									Agar		Bouillon	
									Srg.	Gbdg.	Srg.	Gbdg.
18	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (3 Tage)*	weißlich**	graugelb, flach, feucht glänzend	+	—	+	0 (35)	+	++	+	++	(+)
22	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (4 Tage)	weißlich	grauweißlich bis bräunlich, erhaben, saftig glänzend	+	—	+	0 (35)	++	++	++	++	++
33	Mais (3 Std.)	weißlich	graugelb bis bräunlich, flach, feucht glänzend	+	—	+	0 (35)	+	+	+	++	++
279	Gras mit Säurezusatz (3 Std.)	weißlich	graubräunlich, flach, feucht glänzend	+	—	+	0 (35)	+	+	+	++	+
307	Gras mit Säurezusatz (3 Std.)	weißlich	graugelblich, schwach erhaben, saftig glänzend	++	—	+	0 (35)	++	++	++	++	++
312	Gras (2 Tage)	weißlich	grauweißlich bis bräunlich, flach, feucht glänzend	++	—	+	0 (35)	+	+	+	++	+
317	Gras (3 Tage)	gelblich	graugelb, flach, fast trocken, matt	(+)	—	+	0 (35)	+	++	+	++	(+)
26	Mais (frisch)	gelbbräunlich	bräunlichgelb, flach, feucht glänzend	++	—	+	+ (9)	+	++	—	+	—
30	Mais (frisch)	gelbbräunlich	schwach bräunlichgelb, etwas erhaben, saftig glänzend	+	—	+	+ (9)	+	++	—	++	—
300	Gras (1 Tag)	gelbbräunlich	bräunlichgelb, flach, feucht glänzend	+	—	+	+ (9)	+	++	—	++	—
302	Gras (1 Tag)	gelbbräunlich	mattgelblich, flach, feucht glänzend	+	—	+	+ (9)	+	++	—	++	—
11	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (1 Tag)	weißlich	dunkelgrau bis violett, flach, feucht glänzend	(+)	—	+	0 (35)	—	+	+	+	—
15	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (2 Tage)	weißlich	schmutzig weiß bis bräunlich, erhaben, saftig glänzend	(+)	—	+	0 (35)	—	+	+	++	++
295	Gras mit Säurezusatz (1 Tag)	weißlich	grauweißlich bis bräunlich, erhaben, saftig glänzend	(+)	—	+	0 (35)	—	+	+	++	+
316	Gras (3 Tage)	weißlich	graugelblich, flach, feucht glänzend	++	—	+	0 (35)	—	+	+	++	(+)
17	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (2 Tage)	weißlich	graubräunlich, flach, feucht glänzend	++	—	+	+ (18)	—	+	—	++	—
20	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (5 Tage)	weißlich	gelbbräunlich, erhaben, saftig glänzend	++	—	+	+ (20)	—	+	—	++	—

* Die Zeiten hinter den Herkunftsangaben bedeuten, wie lange das Futter zwecks Konservierung mit oder
** Die Form der Kolonien auf Bouillonagar war stets coliähnlich. Die Organismen bestanden im allgemeinen
*** Die Zahl in der Klammer gibt an, wie viel Stämme dieser Art unter den 100 isolierten Organismen vor-

isolierten *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien.

in	Traubenzuckerzersetzung in				Milchgerinnung (nach Tagen)	Bromthymolblauagar		Probe			Gruppenaufstellung
Galle-Gentianaviolett-Bouillon	Agar		Bouillon			Farbe des Agars	Farbe der Kolonien	Methylrot-	*Voges-Proskauer-*	*Koser-* Citrat-	
Gbdg.	Srg.	Gbdg.	Srg.	Gbdg.							
+	++	+	++	(+)	+ (7)	gelb	dunkelorange	+	–	–	*Bact. coli commune Escherich* (8)***
++	++	++	++	++	+ (7)	gelb	dunkelorange	+	–	–	
++	++	++	++	++	+ (5)	gelb	dunkelorange	+	–	–	
++	++	+	++	++	+ (7)	orangegelb	dunkelorange	+	–	–	
++	++	++	++	++	+ (7)	gelb	dunkelorange	+	–	–	
++	++	+	++	+	+ (7)	gelb	dunkelorange	+	–	–	
++	(+)	(+)	++	(+)	+ (7)	schwach gelb	dunkelorange	(+)	–	–	*Bact. synxanthum Ehrenberg* (1)
(+)	+	–	+	–	+ (5)	schwach gelb	dunkelorange	+	+	–	*Bact. coli var. luteoliquefaciens Holliger* (4)
–	++	–	++	–	+ (5)	gelb	orange	+	+	–	
–	++	–	++	–	+ (7)	gelb	dunkelorange	(+)	–	–	
–	++	–	++	–	+ (8)	schwach gelb	dunkelorange	+	–	–	
++	++	++	+	+	+ (7)	gelb	dunkelorange	+	–	+	*Bact. coli anindolicum* (7)
++	+	++	++	++	+ (5)	gelb	dunkelorange	+	–	–	
++	++	+	++	+	+ (7)	gelb	dunkelorange	+	((+))	–	
++	++	++	++	++	+ (11)	schwach gelb	dunkelorange	+	–	–	
+	(+)	++	++	+	+ (9)	olivgrün	weißlichgrün	+	((+))	+	*Bact. coli var. albidoliquefaciens Holliger* (21)
+	+	+	+	+	+ (5)	schwach gelblich	schwach orange	+	–	+	

ohne Säurezusatz gepreßt gelagert hatte.
aus kurzen kräftigen Stäbchen. Nur die Stämme 279, 11, 6, 261, 5 und 289 hatten etwas schlankere Formen.
handen waren.

Tabelle I

Stamm	Herkunft	Farbe der Kolonien auf Bouillonagar	Wachstum auf Kartoffeln	Beweglichkeit	Gramfärbbarkeit	Katalaseprobe	Gelatineverflüssigung (nach Tagen)	Indolbildung	Milchzuckerzersetzung Agar Srg	Milchzuckerzersetzung Agar Gbdg	Milchzuckerzersetzung Bouillon Srg	Milchzuckerzersetzung Bouillon Gbdg.
27	Mais (frisch)	weißlich	grauweiß bis gelblich, flach, feucht glänzend	(+)	−	+	+ (15)	−	++	−	++	−
271	Gras mit Säurezusatz (3 Std.)	weißlich	gelbbraun, erhaben, saftig, schleimig	++	−	+	++ (13)	−	+	−	+	−
298	Gras mit Säurezusatz (1 Tag)	gelbbräunlich	orangegelb, zarte Auflage, trocken	++	−	+	++ (6)	−	+	−	+	−
301	Gras (1 Tag)	gelbbräunlich	orangegelb, flach, feucht, mattglänzend	+		+	+ (21)	−	(+)	−	(+)	−
1	Rieselfeldergras (frisch)	gelbbräunlich	gelbbräunlich, flach, feucht glänzend	++	−	+	++ (10)	−		−	−	−
6	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (3 Std.)	weißlich	schwach rötlichgelb, erhaben, saftig glänzend	+	−	+	0 (35)		+	−	+	−
29	Mais (frisch)	gelblich	gelblich, flach, feucht glänzend	++	−	+	+ (15)	−		−	−	−
260	Gras (frisch)	gelblich	mattgelb, flach, feucht glänzend	++	−	+	+++ (4)	−	(+)	((+))	(+)	((+))
261	Gras (frisch)	weißlich	braun, flach, feucht glänzend	++	−	+	+++ (4)	−	−	−	−	
262	Gras (frisch)	gelblich	gelbbräunlich, flach, feucht glänzend	++	−	+	++ (11)	−	−	−	−	−
277	Gras mit Säurezusatz (3 Std.)	gelblich	gelbbräunlich, etwas erhaben und schleimig	+	−	(+)	+ (13)	−	+		+	−
290	Gras (frisch)	gelblich	gelbbräunlich, flach, matt, trocken	++		+	+ (13)	−	−	−	(+)	−
2	Rieselfeldergras (frisch)	weißlich	weißlich, etwas erhaben saftig glänzend, schleimig	++	−	+	+++ (3)	−	−	−	alkalisch	
5	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (3 Std.)	weißlich	schwach graugelb, flach, feucht glänzend	+	−	+	+++ (3)	−		−	alkalisch	−
7	Rieselfeldergras mit Säurezusatz (3 Std.)	weißlich	gelbbräunlich, flach, feucht glänzend	+	−	+	+++ (3)	−	−	−	alkalisch	
289	Gras (1 Tag)	weißlich	matt grauweiß flach, feucht glänzend	++	−	+	+++ (9)	−	−	−	alkalisch	−
Bact. coli Haar	Vergleichsstamm *	weißlich	gelbbräunlich, erhaben, saftig, glänzend	+	−	+	0 (35)	++	++	++	++	++

* Aus der Forschungsstelle für landwirtschaftliche Gärungen in Berlin

(Fortsetzung).

in	Traubenzucker-zersetzung in				Milch-gerinnung (nach Tagen)	Bromthymolblau-agar		Probe			Gruppen-aufstellung
Galle-Gentiana-violett-Bouillon	Agar		Bouillon			Farbe des Agars	Farbe der Kolonien	Methylrot-	*Voges-Proskauer-*	*Koser-*Citrat-	
Gbdg.	Srg	Gbdg	Srg	Gbdg							
–	++	–	++	–	+ (5)	gelb	dunkel-orange	+	(+)	+	*Bact coli var. albidoliquefaciens Holliger* (21)
–	+	–	+	–	+ (12)	olivgrün	dunkel-orange	–	+	–	
–	+	–	+	–	+ (11)	gelb	dunkel-orange	–	(+)	(+)	*Bact flavum Fuhrmann* (5)
–	+	–	+	–	+ (12)	gelb	dunkel-orange	–	+	+	
–	+	–	+	–	+ (11)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	+	–	–	*Bact herbicola*-Arten (45)
–	–	–	–	–	+ (11)	schwach gelblich	dunkel-orange	+	–	–	
+	-	–	–	–	+ (10)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	–	–	+	
+	+	(+)	(+)	(+)	+ (7)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	+	–	–	
–		–	–		+ (8)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	–	–	–	
–	–	–	–		+ (11)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	–	+	–	
–	((+))	–	(+)	–	+ (7)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	+	–	–	
+	+	–	+	–	+ (11)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	+	-	–	
–	–	–	–	–	peptonisiert (12)	dunkel-blaugrün	dunkel-olivgrün	+	+	++	nicht näher bestimmte Arten (9)
–	–	-		–	peptonisiert (9)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	+	–	–	
–	–	–	–	–	peptonisiert (10)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	–	–	–	
–	–	–	–	–	peptonisiert (9)	nicht gewachsen	nicht gewachsen	–	–	–	
++	++	++	++	++	+ (16)	gelb	dunkel-orange	+	–	–	

von Säuren ausgesetzt gewesen waren, traten neun Indolbildner auf, von denen nur einer, nämlich Stamm 317, auf Agar und Gelatine gelbbräunliche Kolonien bildete, aber Gelatine nicht verflüssigte. Dieser Befund berechtigt zu der Annahme, daß die gelblichen Indolbildner empfindlicher gegen Säure sind und darum bei der biologischen Untersuchung des eingesäuerten grünen Pflanzenmaterials um so seltener gefunden werden, je saurer das Futter geworden ist. Die weißlichen und durchscheinenden indolbildenden Stämme dagegen besitzen eine größere Widerstandsfähigkeit gegen Säuren und treten deshalb stärker auf den Platten in Erscheinung, die von saurerem Material gegossen wurden.

Die Organismen Nr. 18, 22, 33, 279, 307 und 312 erwiesen sich nach allen ihren Eigenschaften als *Bact. coli commune Escherich* [*K. B. Lehmann* und *R. O. Neumann* (37), *I. E. Minkewitsch* (43), *R. Kopp* (31)]. Bei Stamm 317, der nur in der gelblichen Farbe seiner Kolonien auf Agar und Gelatine von den vorhergehenden abweicht, scheint es sich um das von *K. B. Lehmann* und *R. O. Neumann* angegebene *Bact. synxanthum Ehrenberg* zu handeln.

Die in der Tabelle folgenden Stämme 26, 30, 300 und 302 unterscheiden sich, wie bereits erwähnt, von den vorher genannten zunächst dadurch, daß sie Gelatine verflüssigen. Sie zeigen alle eine gelbbräunliche Farbe der Kolonien, so daß sie zu *Bact. coli var. luteoliquefaciens*, das *W. Holliger* (19) beschreibt, gerechnet werden müssen. Die beiden zuerst genannten Stämme zeichnen sich weiter dadurch aus, daß sie Milch- und Traubenzucker ohne Gasbildung zersetzen. Über eine gleiche Variation berichten auch *F. Levy* (38) und *I. E. Minkewitsch* (43), die fünf Grundtypen für die *Coli-Aerogenes*-Gruppe angeben. Nach diesen Autoren würden die beiden Stämme zu Typus III *Bact. coli-aerogenes* zu rechnen sein. Die Stellung des Stammes 26 ist in diesem System jedoch nicht ganz eindeutig, da er bei der Prüfung in Galle-Lactose-Gentianaviolett-Peptonwasser Milchzucker unter Gasbildung vergärt.

Diese Nährflüssigkeit wird von *M. A. Kessler* und *I. C. Swenarton* (24) zu Elektivkulturen für *Coli-Aerogenes*-Bakterien benutzt und auch von *K. I. Demeter* (4) und *I. E. Minkewitsch* (42) für die Untersuchung der Milch auf Organismen dieser Gruppe empfohlen. Die hier behandelten Stämme wurden gleichfalls nach dieser Methode geprüft und die Ergebnisse in der Tabelle aufgeführt.

Alle nun folgenden Stämme unterschieden sich von den vorhergehenden grundlegend dadurch, daß sie in Bouillon kein Indol bildeten. Da in allen Fällen schon die Ausgangskulturen sofort nach Isolieren der Stämme auf ihre Fähigkeit, Indol zu bilden, geprüft wurden, steht fest, daß sie diese Eigenschaft von vornherein nicht besessen haben. Die Indolreaktion wurde stets nach *N. Kovács* (33) angestellt.

Die Stämme 11, 15, 295 und 316 verhalten sich im übrigen genau so wie echte *Coli*-Bakterien.

Monias (45), der 75 *Coli*-Stämme untersuchte, teilte diese Organismen in indolbildende und nicht indolbildende ein. Von *P. Fabry* (11) wurde ebenfalls ein nicht indolbildendes *Bact. coli* gezüchtet, das er *Bact. coli communior* nannte. Während *R. Kopp* (31) berichtete, daß er bei der Bestimmung der Fäkaltiter nach *A. Gersbach* (15) bei der Wasseruntersuchung mitunter ein typisches *Bact. coli anindolicum* fand, beschrieb *W. Benecke* (1) von Gras isolierte *Coli*-Stämme, denen Indolbildung fehlte.

Die Eigenschaften der Kulturen 17, 20, 27 und 271 stimmen weitgehend mit denen von *Bact. coli var. albidoliquefaciens Holliger* überein, nur ist bei ihnen die Gasbildung in zuckerhaltigen Nährböden weniger regelmäßig. Sie sollen sich in dieser Beziehung eigentlich wie *Bact. coli* verhalten. Doch kommen, wie *K. B. Lehmann* und *R. O. Neumann*, gestützt auf Untersuchungen von *F. Levy* (38), erwähnen, auch nicht gasbildende Organismen dieser Art vor. Die Kulturen 17 und 20 zeigen weder in Milchzuckeragar noch in Milchzuckerbouillon Gasbildung, sondern nur in der Galle-Lactose-Nährflüssigkeit. Die beiden übrigen Kulturen zersetzten Milchzucker überhaupt nicht unter Gasbildung. *H. Geilinger* (14) fand bei seinen Untersuchungen über die Bakterienflora des Mehles ebenfalls Organismen, die er zu der genannten Gruppe stellte.

Die Stämme 293 und 301 gehören ihrem ganzen Verhalten nach am wahrscheinlichsten zu *Bact. flavum Fuhrmann* (13).

Als nächste Gruppe ist *Bact. herbicola L. und N.* zu nennen, der die Stämme 1, 6, 29, 260, 261, 262, 277 und 290 wegen der im allgemeinen fehlenden Gasbildung nahestehen. Bis auf die Stämme 6 und 277 unterscheiden sie sich aber von dieser Gruppe durch ihre mehr oder weniger starke Gelatineverflüssigung. Auch weichen sie von dem typischen *Bact. herbicola* in der Farbe der Kolonien ab. Als weiße Farbenvarietäten dieser Gruppe sind die Stämme 6, 261 und 277 zu nennen. Einen Stamm mit roter Farbstoffbildung und ohne Gelatineverflüssigung beschreibt *M. Düggeli* (8) unter der Bezeichnung *Bact. herbicola var. rubrum.*

Obwohl die übrigen Stämme 2, 5, 7 und 289 in ihren morphologischen Eigenschaften, in der Form und Farbe der Kolonien, sowie in der Nichtfärbbarkeit nach *Gram* mit den *coli*ähnlichen Bakterien übereinstimmen, sind sie doch nicht zu einer der hier aufgeführten Arten zu rechnen. Durch ihre Unfähigkeit, Zucker zu vergären, und ihr Verhalten in Milch, die sie peptonisieren und ebenso wie Milchzuckerbouillon alkalisch machen, entfernen sie sich zu weit von der *Coli-Aerogenes*-Gruppe.

Untersuchung der Kulturen nach der amerikanischen Methode. — Neben den vorher beschriebenen Untersuchungen über die Zucker-

vergärung, Indolbildung, Gelatineverflüssigung usw. wurden die ausgewählten Stämme noch den vier Prüfungen unterzogen, die in Amerika zur Diagnostizierung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* bei der Wasseruntersuchung angewendet werden [*Standard Methods of Water-Analysis* (57)]. Dahin gehören außer der Indolprobe die *Voges-Proskauer*-, die Methylrot-, die *Koser*sche Citratprobe und die Prüfung auf Bromthymolblauagar nach *H. J. Burke* und *O' D. Gaffney* (3).

C. C. Ruckhoff, *I. C. Kallas*, *B. Chinn* und *E. W. Coulter* (53) fanden die Indolreaktion bei *Bact. coli* sehr beständig, auch bei Passagen durch die verschiedensten Nährböden. Allerdings ließ sich, wie aus der von ihnen aufgestellten Tabelle hervorgeht, aus dem Auftreten dieser Reaktion bei der Untersuchung von Wasser zur Feststellung des *Coli*-Titers nicht mit Bestimmtheit darauf schließen, daß sie allein von *Bact. coli* hervorgerufen wurde, da sie auch bei Gegenwart von *Bact. aerogenes* in Mischkulturen mit fremden Organismen eintreten konnte. Bei Reinkulturen ist die Indolbildung in Zweifelsfällen immer ausschlaggebend für die Unterscheidung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes*. In ähnlicher Weise äußerte sich über den Wert der Indolprobe bei Mischkulturen *L. E. den Dooren de Jong* (7), der Indolbildung auch bei einem Stamm von *Bac. megaterium* und bei *Bact. proteus* feststellte. Nach *W. Blumenberg* (2) tritt ferner bei einzelnen Stämmen von *Bact. cloacae* Indolbildung auf.

Die *Voges-Proskauer*-Probe beruht auf der Fähigkeit einiger Mikroorganismen, in zuckerhaltigen Nährlösungen Acetoin zu bilden [*F. Voges* und *B. Proskauer* (59)]. Das Acetoin, das unter Mitwirkung des Luftsauerstoffs langsam zu Diacetyl oxydiert und durch die hinzugefügte starke Lauge in Chinon übergeführt wird, liefert mit den Amidgruppen der Peptonlösung rotgefärbte Chinone. *C. C. Ruckhoff* und Mitarbeiter (53) geben diese Probe als unbedingt zuverlässig für den Nachweis von *Coli*-Bakterien in Wasser an. Da die Gewinnung der Kulturen 4 Tage dauert und die Reaktion erst nach weiteren 12 Stunden abzulesen ist, hat *C. H. Werkman* (61) die Methode dadurch etwas abgekürzt, daß er zu der Kultur nach der Bebrütung einige Tropfen Ferrichloridlösung hinzugibt. Auf diese Weise wird nicht nur die Reaktion sofort hervorgerufen, sondern auch der Aufenthalt der Kulturen im Brutschrank auf 3 Tage verringert.

G. A. Lindsay und *C. M. Meckler* (39) veränderten die Methode von *C. H. Werkman* (61), indem sie einfache Nährbouillon verwendeten und diese nur 24 Stunden bebrüteten. Nach dieser Zeit wird die Reaktion in der gleichen Weise angestellt, wie es *C. H. Werkman* angegeben hat. Eine zweite Schnellmethode der genannten Autoren zur Unterscheidung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* beruht auf dem verschiedenen Reduktionsvermögen der beiden Bakterienarten, das durch Hinzufügen von Methylenblau zu der 24 Stunden lang bei 37° bebrüteten Bouillonkultur geprüft wird.

Gegen die *Voges-Proskauer*-Probe sowie gegen die Methylrot-Probe, zu der die andere Hälfte derselben Kultur benutzt wird, sind von verschiedenen Seiten Einwände erhoben worden. Nach *M. Klimmer*, *H. Haupt* und *F. Borchers* (27) sowie *M. Klimmer*, *H. Haupt* und *R. Roots* (28) zeigten die beiden Proben bei ihren Versuchen so ungenaue Ergebnisse, daß man sie als unzuverlässig bezeichnen muß. Die Unsicherheit in der Unterscheidung von *Coli* und *Aerogenes* nach den beiden Proben, auf die auch *I. W. Nungester* und *S. A. Anderson* (50) hinweisen, veranlaßten *H. J.*

Burke und *O'D. Gaffney* (3), einen Nährboden zusammenzustellen, durch den es mit Sicherheit gelingen soll, die beiden Bakterienarten diagnostisch voneinander zu trennen. Zu diesem Zwecke empfehlen sie einen Glucose-Phosphat-Bromthymolblau-Agar, auf dem *Bact. coli* orangegelbe und *Bact. aerogenes* grasgrüne Kolonien bildet. Da auf diesem Nährboden auch *Staphylococcen* gut wachsen und wie *Bact. coli* orangegelbe Kolonien bilden, setzen *M. Klimmer*, *H. Haupt* und *F. Borchers* (27) dem Nährboden außerdem noch Trypaflavin zu, das die Entwicklung jeglicher Begleitflora verhindern soll.

Die Acetoinbildung, die die Grundlage der *Voges-Proskauer*-Reaktion bildet, ist eine Eigenschaft, die bei den Bakterien sehr verbreitet ist [*A. Péré* (51), *H. Desmots* (5), *L. Grimbert* (16), *H. Schmalfuss* und *H. Barthmeyer* (55), *C. B. van Niel*, *A. J. Kluyver* und *H. G. Derx* (49), *A. J. Kluyver*, *H. J. L. Donker* und *F. Vissert 't Hooft* (29), *C. Neuberg* und *E. Reinfurth* (48), *C. Neuberg* und *G. Gorr* (47), *L. Elion* (9, 10)]. Daher erklären *L. M. Horowitz-Wlassowa* und *C. A. Rodionowa* (20) ebenso wie andere Autoren die *Voges-Proskauer*-Probe zur Differenzierung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* für nur sehr bedingt anwendbar.

Die vierte Probe der *Standard Methods of Water-Analysis* (57) für den Nachweis der Arten in Wasser ist die Citratprobe von *S. A. Koser* (32). Nach ihm beruht die Brauchbarkeit einer citrathaltigen Nährlösung darauf, daß *Bact. aerogenes* Citrate ausnutzt, auch wenn sie die einzige Kohlenstoffquelle sind, *Bact. coli* aber nicht. Untersuchungen von *M. Klimmer*, *H. Haupt* und *F. Borchers* (27) in dieser Richtung führten zu demselben Ergebnis. *K. Pesch* (52), der einen festen citrathaltigen Nährboden beschreibt, legt den Begriff des „*Bacterium coli*" geradezu in der Weise fest, daß von diesem Organismus keine Kolonien auf Citratagar gebildet werden.

Wegen der Unsicherheit jeder einzelnen hier aufgeführten Probe wird von *C. C. Ruckhoff* und Mitarbeitern (53) für die sichere Differenzierung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* immer wieder die Anwendung aller vier gefordert. Sie sehen den Beweis erst dann als erbracht an, wenn alle vier Proben ein eindeutiges Ergebnis zeigen.

I. E. Minkewitsch (43) wendete die in Deutschland üblichen und die amerikanischen Untersuchungsmethoden nebeneinander an und teilte die *Coli-Aerogenes*-Bakterien je nach ihrem Verhalten in den beschriebenen vier Nährmedien und ihrer Fähigkeit, die verschiedensten Zuckerarten mit oder ohne Gasbildung zu vergären, in fünf Gruppen ein. Von *A. I. Salle* (54) werden ebenfalls die vier Proben für geeignet zum Nachweis und zur Unterscheidung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* gehalten, doch wird von ihm, damit man ganz sicher geht, als fünfte Probe die Benutzung eines besonders zusammengestellten Nährbodens empfohlen.

Dagegen lehnen *H. Lehmann* und *H. J. Jusatz* (36) die Proben von *C. C. Ruckhoff* und Mitarbeitern (53) als unbrauchbar zu einer genaueren Unterscheidung von *Bact. coli* und *Bact. aerogenes* ab, da bei ihrer Anwendung die biochemische Veränderlichkeit der *Coli*-Gruppe unter verschiedenen äußeren Einflüssen unberücksichtigt bleibt.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, welches Ergebnis die Untersuchung der vorliegenden Stämme nach der amerikanischen Methode hatte. Die von uns als typische *Coli*-Bakterien erkannten Stämme verhielten sich auch nach den genannten vier Proben genau wie *Bact. coli commune*.

Sie bildeten also auf Bromthymolblauagar orangegelbe Kolonien, waren methylrotpositiv und erwiesen sich gegenüber der *Voges-Proskauer*-Probe und der *Koser*schen Citratprobe als negativ. Sobald aber irgendwelche kleinen Abweichungen von dem Grundtypus des *Bact. coli* auftraten, fielen die drei zuletzt erwähnten Proben sehr wechselnd aus. Auch innerhalb der einzelnen nach *K. B. Lehmann* und *R. O. Neumann* aufgestellten Gruppen ergaben sich die verschiedensten Zusammenstellungen.

Schon in der Gruppe des *Bact. coli var. luteoliquefaciens*, die wegen ihrer Indolbildung dem typischen *Bact. coli* noch ziemlich nahesteht, zeigen zwei Stämme (Nr. 26 und 30) eine abweichende *Voges-Proskauer*-Reaktion. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Gruppe *Bact. coli anindolicum*, die dem *Bact. coli* noch naher steht als die vorher genannte Art. Während ein Stamm (Nr. 295), wenn auch nur schwach, die *Voges-Proskauer*-Reaktion gibt, zeigt ein anderer (Nr. 11) deutliches Wachstum in *Koser*scher Citratlösung. Noch größere Abweichungen machen sich bei den unter *Bact. coli var. albidoliquefaciens* zusammengefaßten Organismen bemerkbar, da sie fast samtlich nach *Koser* positiv sind. In einem Falle (Nr. 271) war sogar die Methylrotprobe negativ.

Unter den *herbicola*ahnlichen Stämmen kommen sowohl solche (Nr. 1, 6, 260, 277 und 290) vor, die nach den amerikanischen Proben die typischen Eigenschaften von *Bact. coli* zeigen, als auch mehr oder weniger stark davon abweichende (Nr. 29, 261 und 262). Obwohl sich also alle Organismen dieser Gruppe nach dem deutschen Untersuchungsverfahren weitgehend von *Bact. coli* entfernen, müßten sie nach der amerikanischen Methode zum Teil unbedingt als ausgesprochene Vertreter dieser Bakterienart bezeichnet werden. — Besonders bemerkenswert ist das Ergebnis bei den Organismen der Gruppe *Bact. flavum*, die nach den drei amerikanischen Proben zu *Bact. aerogenes* gerechnet werden müßten, während das Fehlen der Gasbildung in zuckerhaltigen Nährmedien deutlich darauf hinweist, daß sie nicht dazu gehören können.

Eine Sonderstellung unter den amerikanischen Proben nimmt der Bromthymolblauagar von *H. J. Burke* und *O' D. Gaffney* ein, auf dem die Kolonien fast aller Stämme die für *Bact. coli* typische orangegelbe Farbe zeigten. Nur zwei Kulturen (Nr. 2 und 17) machten davon eine Ausnahme, gaben aber nicht die für *Bact. aerogenes* charakteristische grasgrüne Farbe. Fast sämtliche *herbicola*ähnlichen Organismen sowie die in der letzten Gruppe aufgeführten nicht näher bestimmten Stämme, mit Ausnahme von Kultur Nr. 2, kamen auf diesem Spezialagar nicht zur Entwicklung.

Demnach hat sich ein Bakterium, das sich sowohl nach den vier amerikanischen Proben als auch nach der deutschen Untersuchungs-

methode einwandfrei als *Bact. aerogenes* erwies, unter den geprüften Stämmen nicht finden lassen.

B. Temperaturoptimum und -maximum der Organismen.

Vielfach wird hervorgehoben, daß das gewöhnliche *Bact. coli*, das von Warmblütern stammt, noch bei 45 bis 46° die verschiedenen Reaktionen zeigt. *R. Kopp* (31) verlangt z. B. für die Bestimmung des Fäkaltiters von *Bact. coli*, daß sowohl die Indol- als auch die Gasbildung bei 45° eintreten, während *A. Gersbach* (15) die Indolbildung auch bei 37° als Beweis für die Gegenwart von *Bact. coli* ansieht. Nach *I. E. Minkewitsch* (42, 44) muß die Zersetzung der Zuckerarten unter Gas- und Säurebildung wieder bei 46° vor sich gehen, wenn daraus auf *Bact. coli* geschlossen werden soll. An anderer Stelle allerdings stellt derselbe Forscher [vgl. *F. Levy* (38)] fest, daß Bebrütung der Gärröhrchen mit der von *Beclir* modifizierten *Eijkman*schen Lösung bei 37° und bei 46° keine großen Unterschiede ergibt.

Die von den eben genannten Autoren benutzten *Coli*-Kulturen stammten aus dem Darm von Menschen und Tieren und wurden als Verunreinigung im Wasser gefunden. Es ist daher von Belang zu untersuchen, bei welchen Temperaturen sich die von grünen Pflanzen isolierten *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien am besten entwickeln, und bei welchen Höchsttemperaturen ungefähr sie ihr Wachstum einstellen.

Zu den folgenden Versuchen dienten sämtliche indolbildenden Stämme. Sie wurden in Bouillon geimpft und bei Zimmertemperatur, bei 30, 37, 41 und 46° zwei Tage lang bebrütet. Nach dieser Zeit waren alle Stämme bei Zimmertemperatur, 30 und 37° mehr oder weniger gut gewachsen. Die Temperaturen von 30 und 37° erwiesen sich als besonders günstig, während die Entwicklung bei Zimmertemperatur etwas zurückgeblieben war.

Bei 41° wuchsen nur noch die typischen *Coli*-Stämme, während sich die gelbwachsenden, indolbildenden Arten der Gruppe *Bact. coli var. luteoliquefaciens Holliger* auch bei längerem Aufenthalt im Brutschrank nicht vermehrten, sondern sogar abstarben.

Eine Temperatur von 46° vertrug nur das in allen Fällen zu Vergleichszwecken herangezogene *Bact. coli Haar*, das aus menschlichem Darm isoliert worden war. Die Fähigkeit, Indol zu bilden, hatten alle Stämme bei den Temperaturen, bei denen sie noch gewachsen waren, beibehalten.

Ein weiterer Versuch, der zeigen sollte, ob die Schichthöhe der Nährlösung das Wachstum bei den einzelnen Temperaturen beeinflußte, ergab keine Unterschiede.

Es wurden drei verschiedene Schichthöhen benutzt: 1. 3 ccm Bouillon in schmalen Reagensröhrchen mit einer Schichthöhe von 5 cm, 2. 5 ccm Bouillon in Röhrchen von normaler Weite mit einer Schichthöhe von 3 cm, 3. 10 ccm Bouillon in 100 ccm-*Erlenmeyer*-Kölbchen mit einer Schichthöhe von 0,2 bis 0,3 cm. Irgendwelche Unterschiede in der Schnelligkeit oder

Stärke des Wachstums traten hierbei in keinem Fall zutage. Auch bezüglich der Indolbildung waren keine Unterschiede bemerkbar.

Die Kulturen der für jeden Stamm ermittelten höchsten Wachstumstemperatur wurden nun zur Beimpfung eines gewöhnlichen Bouillonröhrchens benutzt. Nach achtmaligem Umsetzen in Abständen von je zwei Tagen und Weiterzüchten der Organismen bei der festgestellten Maximaltemperatur stellte man das neunte Röhrchen bei der nächst höheren Temperatur auf, um zu prüfen, ob infolge Gewöhnung jetzt Wachstum eintrat. Die genannte Behandlung der Kulturen hatte aber keinen Erfolg. Die Organismen, die bei den erhöhten Wärmegraden gehalten wurden, wuchsen nicht nur nicht an, sondern gingen sogar zugrunde, wie sich daraus ergab, daß sie auch dann nicht mehr den Nährboden trübten, wenn sie nach 2 bis 3 Tagen wieder in den Brutschrank mit den Ausgangstemperaturen kamen.

Offenbar hängt dieses Verhalten mit der Herkunft der Stämme zusammen, da das aus dem Darm isolierte *Bact. coli Haar* noch bei 46^0 wuchs, obwohl es schon jahrelang bei niederen Temperaturen gezüchtet worden war, während sich die von grünen Pflanzen kommenden Stämme, soweit es sich dabei um echte *Coli*-Arten handelte, zwar noch bei 41^0 vermehrten. aber nicht mehr bei höheren Temperaturen. Die atypischen Stämme waren sogar nur bis 37^0 lebensfähig.

C. Verhalten der indolbildenden Stämme bei Aufenthalt in sterilem Leitungswasser.

Veranlaßt durch die Angaben von *W. Blumenberg* (2), *C. Diénert* (6), *F. Sieke* und *P. Keim* (56), daß *Bact. coli* die Fähigkeit zur Indolbildung bei längerem Aufenthalt in Wasser verliere, ist von uns in einer besonderen Versuchsreihe gepruft worden, wie sich die von grünen Pflanzen stammenden indolbildenden Stämme in dieser Hinsicht verhielten.

Versuchsanordnung. In gewöhnliche Reagensgläser füllte man je 8 ccm Leitungswasser und sterilisierte sie $^1/_2$ Stunde im Dampftopf. Von 24 Stunden alten Bouillonschrägagarkulturen wurde dann mit der Nadel so viel Bakterienmasse in die Röhrchen gegeben und an den Wandungen sorgfältig verrieben, daß eine gleichmäßige schwache Trübung entstand. Von diesen Aufschwemmungen wurde je eine von jedem Stamm bei Zimmertemperatur und eine bei 30^0 aufgestellt, um auf diese Weise gleichzeitig den Einfluß der Temperatur zu untersuchen. Einer Verdunstung des Wassers in den Rohrchen beugte man dadurch vor, daß man sie in *Weck*gläser stellte, deren Öffnung mit einer Gummikappe verschlossen wurde. Diese Maßnahme bewährte sich gut, da der Wasserspiegel während der ganzen Versuchsdauer kaum merkbar sank. Auch eine Entwicklung von Schimmelpilzen trat nicht ein.

Versuchsergebnisse. Nach 16 Tagen war ein Teil der Stämme, die bei Zimmertemperatur gestanden hatten, bereits eingegangen, und zwar ausschließlich solche, die auf Bouillonagarplatten in gelbbräunlichen

Kolonien wuchsen und Gelatine verflüssigten. Diese waren bis auf einen alle zugrunde gegangen. Die übrigen, echten *Coli*-Arten hatten ihre Lebensfähigkeit und die Eigenschaft, Indol zu bilden, bewahrt.

Die bei 30° aufgestellten Wasseraufschwemmungen boten nach der gleichen Zeit insofern ein etwas anderes Bild, als hier alle gelbwachsenden Stämme eingegangen waren und außerdem von den echten *Coli*-Bakterien zwei Stämme in der Nährbouillon nicht mehr anwuchsen. Nur vier von den im ganzen gefundenen 13 indolbildenden Stämmen entwickelten sich noch in dieser Versuchsreihe. Die Fähigkeit zur Indolbildung war hier ebenso wenig wie in dem ersten Falle verlorengegangen. Eine Wiederholung dieses Versuchsteils mit den Wasseraufschwemmungen ergab in allen Einzelheiten das gleiche Bild.

Offenbar ist die Zimmertemperatur nicht so schädlich wie die höhere Temperatur. Diese ist den Organismen auf die Dauer wahrscheinlich deshalb weniger zuträglich, weil sie in der freien Natur nur seltener vorkommt. Die Zimmertemperatur mit ihren Schwankungen nach oben und unten entspricht mehr den natürlichen Verhältnissen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen *M. Tresh* und *C. Beale* (58), nach denen *Bact. coli* in Wasser bei höheren Temperaturen schneller als bei Zimmertemperatur abstirbt. Bei Zimmertemperatur ging der Prozeß in kleineren Gefäßen wiederum schneller vonstatten als im Freien in größeren Behältern. Aus den Untersuchungen von *R. Koch* (30) ergab sich ebenfalls, daß das Absterben der *Coli*-Keime in Bier bei 4 bis 5° langsamer erfolgt als bei 20°.

Die weitere Prüfung der Wasseraufschwemmungen wurde nach 30, 65, 112, 177, 210 und 370 Tagen vorgenommen. Die Ergebnisse stimmten fast vollständig mit den schon nach 16 Tagen gefundenen überein. Nur hatte sich der Unterschied in dem Einfluß der beiden Temperaturen insofern etwas verschoben, als nach 65 Tagen auch der letzte der gelbwachsenden gelatineverflüssigenden Stämme bei Zimmertemperatur eingegangen war. Die Fähigkeit zur Indolbildung konnte bei allen am Leben gebliebenen Stämmen noch in derselben Stärke nachgewiesen werden. Beim Vergleich der übrigen Eigenschaften, wie Zuckerzersetzung unter Gasbildung, Acetoinbildung, Verhalten in Milch, auf Kartoffeln und in Gelatine, stellte sich bei den einzelnen Organismen auch nach 370 Tagen nicht der geringste Unterschied gegenüber den Merkmalen der Ausgangskulturen heraus.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Die gelbwachsenden gelatineverflüssigenden Indolbildner sind so wenig an einen Aufenthalt im Wasser angepaßt, daß sie darin fast alle innerhalb von 16 Tagen absterben. Die typischen *Coli*-Bakterien dagegen vertragen den Aufenthalt im Wasser sehr gut. Eine Temperatur von 30° wirkt auf die Organismen, und zwar auch auf die typischen *Coli*-Arten, im Wasser ungünstiger

als Zimmertemperatur. Die Fähigkeit zur Indolbildung ging selbst bei 370tägigem Aufenthalt im Wasser in keinem einzigen Fall verloren, so daß sich die Beobachtungen von *W. Blumenberg* (2), *C. Diénert* (6), *F. Sieke* und *P. Keim* (56) nicht bestätigen ließen. Vielmehr zeigte sich die Indolbildung als eine sehr konstante Eigenschaft der Organismen, wie auch *C. C. Ruckhoff* und Mitarbeiter (53) feststellten. *L. W. Kulp* (35), der *Bact. coli* jahrelang in steriler Gartenerde hielt, kommt dabei zu dem Ergebnis, daß die Indolbildung in der Stärke zwar etwas schwankt, aber doch bestehen bleibt.

D. Verhalten der indolbildenden Stämme auf zuckerreichem Nährboden.

Zu dem vorerwähnten Ergebnis führte ein anderer Versuch mit den indolbildenden Stämmen. Es sollte geprüft werden, ob sich die Eigenschaften der Organismen, und zwar besonders ihre Fähigkeit zur Indolbildung, dadurch beeinflussen ließen, daß sie längere Zeit auf einem eiweißarmen, aber zuckerreichen Nährboden fortgezüchtet wurden. Wie *I. E. Minkewitsch* (44) in Übereinstimmung mit *A. Fischer* (12) berichtet, geht die Fähigkeit des *Bact. coli*, Indol zu bilden, in zuckerhaltigen Nährmedien verloren.

Als Nährboden diente bei unseren Versuchen Bierwürzeagar, der etwa 5 % Zucker enthielt. Die Stämme wurden zunächst 3 Wochen lang täglich auf diesem Nährboden umgeimpft. Dann erfolgte das Umsetzen nur alle 14 Tage. Nachdem die Stämme 3 Monate lang auf Würzeschrägagar gewachsen waren, wurden sie auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

Bei diesem Versuch zeigte sich wiederum, daß die gelbwachsenden gelatineverflüssigenden Formen gegen ungünstige Verhältnisse viel empfindlicher sind als die typischen *Coli*-Arten. Die weniger charakteristischen Formen gingen nach 13maligem Umsetzen ein, nachdem sie schon seit der neunten Überimpfung schwächer gewachsen waren. Solange die Organismen aber noch lebensfähig waren, ließen sie keinerlei Veränderungen ihrer Eigenschaften erkennen.

Ebenso ergaben sich bei der Untersuchung der typischen *Coli*-Bakterien, die 3 Monate auf Würzeagar gewachsen waren, keine Unterschiede gegenüber den Ausgangsstämmen. Die Indolbildung war in allen Fällen unverändert geblieben.

E. Versuche über die Veränderlichkeit der Organismen bei Erhitzung.

Nachdem die Eigenschaften der einzelnen Stämme und die Beständigkeit verschiedener Merkmale untersucht worden waren, wurden die Versuche von *C. Hüttig* (21, 22) über die Veränderung von *Bact. coli* beim Erhitzen in Wasser nachgeprüft. Dabei ist sowohl auf eine Veränderung der Kolonieform als auch der morphologischen und physiologischen Eigenschaften der Organismen geachtet worden.

C. Hüttig (21) teilt mit, daß sich bei Erhitzen seiner *Herbicola*-Stämme auf 58 bis 60° eine Umwandlung der Stäbchenform in die Streptokokkenform feststellen ließ. Diese entstand bei ein oder mehrmaligem Erhitzen von wässerigen Aufschwemmungen dadurch, daß sich die Stäbchen mehr nach dem einen Ende hin teilten und zunächst zwei ungleich lange Organismen bildeten. Durch weitere Teilungen wird dann schließlich aus der Stäbchen- die Streptokokkenform. In einer zweiten Arbeit beschreibt *C. Hüttig* (22) diese Umwandlung allerdings in anderer Weise. Danach wurden aus den ursprünglichen *gram*negativen *Herbicola*-Stäbchen nach mehrmaligem Erhitzen und längerer Kultur auf Schrägagar *gram*labile Stäbchen. Als zu diesem Zeitpunkt die Bakterien dann nochmals erhitzt wurden, entstanden die *gram*positiven Diplokurzstäbchen und Streptokokkenketten, die in allen Eigenschaften dem *Streptococcus lactis Lister Löhnis* glichen. Durch längeres Aufbewahren der so erhaltenen Stämme und fortgesetztes Umsetzen auf Milchzuckeragar oder vorsichtiges Erhitzen auf 55° gelang es *Hüttig* (22) auch, die Organismen aus der Streptokokkenform wieder in die Stäbchenform zurückzuverwandeln.

P. Kuhn und *K. Sternberg* (34), deren Technik *C. Hüttig* (21, 22) übernommen hat, sprechen ebenfalls von einer Verwandlung der *Coli*-Stäbchen in die verschiedensten Formen durch vorsichtiges Erhitzen. Die entstandene Kokkenform entspricht nach diesen Autoren einer von ihnen als C-Form bezeichneten „widerstandsfähigen Form der Bakterien". Sie beobachteten das Auftreten solcher „C-Formen" besonders dann, wenn eine Kultur gewissen schädlichen Einflüssen ausgesetzt worden war. Ähnliche Umwandlungsformen wie *P. Kuhn* und *K. Sternberg* (34) fand auch *W. Hausam* (18), der diese Formen als Übergangserscheinungen innerhalb des Lebenszyklus von *Bact. coli* ansieht. Dagegen lehnt *Ph. Hadley* (17) eine Umwandlung der Bakterien völlig ab, ist vielmehr der Ansicht, daß solche Erscheinungen auf einem Pleomorphismus der Bakterien beruhen[1].

M. Neisser (46) und *E. Klieneberger* (25, 26) haben die Versuche von *C. Hüttig* nachgeprüft und kommen zu dem Schluß, daß es sich dabei um Fremdinfektionen gehandelt haben muß, zumal diese bei der Technik des Ausspatelns gegenüber dem Plattengußverfahren, wie aus Versuchen von *E. Klieneberger* (26) hervorgeht, sehr leicht auftreten. Eine Umwandlung der Organismen, wie sie von *Hüttig* (21, 22) erhalten wurde, gelang *E. Klieneberger* (25) in keinem einzigen Fall.

Auf die Wichtigkeit der Verwendung von absoluten Reinkulturen bei Untersuchungen über die Verwandlung einer Bakterienart in eine andere weist auch *A. I. Virtanen* (60) hin, nach dem sich bei solchen grundlegenden Veränderungen auch der Enzymapparat der Organismen umbilden müsse. Da sich aber derartige Umbildungen nie nachweisen ließen, lehnt *Virtanen* eine Umwandlung der Bakterien ab.

In einer Erwiderung auf die Arbeit von *E. Klieneberger* (26) wendet sich *C. Hüttig* (23) gegen den Vorwurf des unsauberen Arbeitens und schiebt das Versagen ihrer Versuche auf falsche Versuchsanstellung.

Die von uns mit den Stämmen 15, 22 und *Coli Haar* durchgeführten Untersuchungen lehnten sich genau an die Methodik von *C. Hüttig* (22)

---

[1] Vgl. hierzu auch die Angaben in der soeben erschienenen Arbeit von *W. M. F. Lange* (Beziehung zwischen der Formveränderlichkeit und einem Formenkreis bei *Bact. coli*, J. bact. 25, 123, 1933), der einen Lebenszyklus der Bakterien ablehnt.

an. Die 24stündigen Agarreinkulturen wurden mit sterilem Leitungswasser abgeschwemmt und nach Teilung 5, 15, 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 und 90 Minuten lang bei 58 bis 60⁰ im Wasserbad erhitzt. Die so erhaltenen Abschwemmungen dienten zur Ausspatelung auf Chinablau-Traubenzucker- und auf Chinablau-Milchzucker-Agarplatten. Zur Kontrolle wurden von den nicht erhitzten Abschwemmungen mit den beiden zuckerhaltigen Nährböden Platten gegossen. — Außerdem sind von den erhitzten Abschwemmungen mit den gleichen Nährböden Platten gegossen worden, damit durch Vergleich eine bei dem Ausstrichverfahren eingetretene Infektion sofort festgestellt werden könnte. Hierbei bestand allerdings die Gefahr, daß die durch Erhitzung geschwächten Organismen beim Gießen der Platten weniger günstige Bedingungen finden würden als beim Ausstreichen des Impfmaterials.

Die vergleichenden Versuche mit den beiden Verfahren haben hinsichtlich der Form und Farbe der Kolonien keine merklichen Unterschiede gezeigt. Auf den gegossenen Platten wuchsen zwar sehr viel weniger Kolonien als auf den Ausstrichplatten, jedoch reichte ihre Zahl fur Untersuchungen uber etwaige Variationen der Organismen völlig aus. Auf den beiden Zuckernährböden verhielten sich die Bakterienstämme gleich.

Alle Abschwemmungen, die 65 Minuten lang auf 58 bis 60⁰ erhitzt worden waren, ergaben auf den genannten Agarsorten noch Wachstum, wenn auch naturlich die kurzer behandelten mehr Keime zur Entwicklung brachten. Bei 75, 85 und 90 Minuten langem Erwärmen zeigte nur noch ein Stamm (Nr. 22) einzelne Kolonien auf den Platten.

Größe, Form und Farbe der Kolonien sowie mikroskopisches Aussehen der Organismen hatten sich nach dem Erhitzen nicht merklich verändert. Eine Ausnahme machte das zum Vergleich herangezogene *Bact. coli Haar* bei 60 Minuten langem Erhitzen insofern, als es auf der Oberfläche der Platten vereinzelt kleine linsenförmige Kolonien bildete. Aber auch diese wiesen bei der mikroskopischen Untersuchung nur die bekannten kräftigen kurzen Stäbchen auf, die sich physiologisch in keinem Punkt verändert hatten. Bei einem zweiten Versuch gelang es nicht, die kleinen linsenförmigen Kolonien zu erhalten. — Zu demselben Ergebnis führte die Prüfung der beiden übrigen erhitzten Stämme auf ihr physiologisches Verhalten. Sie zeigten nach dem Erhitzen alle in der Tabelle I angegebenen Eigenschaften.

Die Wiederholung des Versuchs mit Abschwemmungen von 3 Wochen alten Schrägagarkulturen an Stelle der 24stündigen brachte kein anderes Ergebnis. Hierbei trat die von *C. Hüttig* (22) erwähnte größere Widerstandsfähigkeit älterer Kulturen gegen das Erhitzen nicht besonders hervor. Immerhin vertrugen sie ein 5 Minuten längeres Erhitzen, so daß sie auch nach 70 Minuten noch ein verhältnismäßig

gutes Wachstum auf den Platten zeigten. Die so gewonnenen Kulturen wurden nun 3 Wochen lang auf Schrägagar gehalten und dabei häufiger umgesetzt. Dann folgte eine Wiederholung des Versuchs, der aber zu keinem anderen Ergebnis führte wie der erste. Ebenfalls zeigte *Bact. coli Haar* keine Veränderung der Kolonieform.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte geprüft werden, ob dadurch eine Veränderung der Organismen zu erreichen wäre, daß man unmittelbar die in gewöhnlicher Bouillon gewachsenen Kulturen auf 58 bis 60° erhitzte. Die Bouillonröhrchen wurden zu diesem Zweck mit einer Nadelspitze voll Bakterienmasse von 24 Stunden alten Schrägagarkulturen beimpft und bei 37° 48 Stunden lang bebrütet. Von jedem der genannten Stämme (Nr. 15, 22 und *Bact. coli Haar*) kamen für den ersten Versuch vier Röhrchen zur Verwendung, von denen je eins 35, 45, 55 und 65 Minuten lang erhitzt wurde. Die weitere Versuchsanordnung war dieselbe wie bei den vorangehenden Versuchen mit Wasseraufschwemmungen.

Die erhitzten Bouillonkulturen hatten, wie die mit ihnen gegossenen Platten bewiesen, erheblich kürzere Zeit dem Einfluß der Wärme widerstanden als die Wasseraufschwemmungen. Nur die Kultur von Stamm 22, die 55 Minuten lang behandelt worden war, brachte auf den Platten noch einige Kolonien hervor. Die übrigen Stämme zeigten ein gutes Wachstum nur noch bei 35 Minuten langem Erhitzen. Morphologische und physiologische Veränderungen konnten in keinem Falle festgestellt werden.

Die zum nächsten Versuch verwendeten Bouillonkulturen hatten 72 Stunden bei 37° gestanden und waren 5, 15, 25 und 35 Minuten lang erhitzt worden. Dabei hatte schon eine 5 Minuten lange Behandlung alle Keime abgetötet. Nur Stamm 22 machte wiederum eine Ausnahme, indem er noch unter diesen Umständen Kolonien auf den Platten bildete. Auch hier waren bei der nachfolgenden Prüfung keinerlei Veränderungen zu beobachten. Die Versuche mit 4 und 5 Tage alten Bouillonkulturen bei 1, 3, 5 und 10 Minuten langem Erhitzen auf 58 bis 60° erwiesen, daß dabei in allen Fällen sämtliche Keime abgetötet worden waren.

Auf den zur Kontrolle von den nicht erhitzten Kulturen gegossenen Platten trat stets bei allen Stämmen unvermindertes Wachstum ein.

Die Erhitzungsversuche mit *Bact. coli* haben gezeigt, daß es nicht gelingt, den Organismus durch verschieden langes Erwärmen auf 58 bis 60° in *Streptococcus lactis* überzuführen, wie es *C. Hüttig* (22) in seinen Versuchen erreicht haben will. Auch die Zwischenformen, die *C. Hüttig* (21) erwähnt, konnten nicht erhalten werden. Nur in einem Fall wies der Vergleichsstamm *Coli Haar* nach 60 Minuten langem Erhitzen der Wasserabschwemmung auf den Platten etwas kleinere, linsenförmige

Kolonien auf, die aber aus unveränderten Stäbchen bestanden und bei der nächsten Plattenpassage wieder in die ursprüngliche Kolonieform übergingen.

Bei einem Vergleich der Versuche mit Wasserabschwemmungen von Bouillonagarkulturen einerseits und mit unmittelbarem Erwärmen der Bouillonkulturen andererseits stellte sich ein merkbarer Unterschied zugunsten der Wasserabschwemmungen heraus, die das Erhitzen länger als die Bouillonkulturen aushielten. Je älter die Bouillonkulturen wurden, um so geringer war ihre Widerstandskraft gegen das Erhitzen. Die Abschwemmungen dagegen zeigten, auch nachdem die Agarkulturen 3 Wochen alt geworden waren, dasselbe Verhalten wie die von den 24stündigen Kulturen.

Zusammenfassung.

Von Rasengras, Rieselfeldergras und Mais wurde eine große Anzahl *Coli*- und *coli*ähnlicher Stämme isoliert und auf ihre morphologischen, kulturellen und physiologischen Eigenschaften hin genau untersucht. Bestimmung und Einordnung der gefundenen Organismen in die verschiedenen Arten der *Coli-Aerogenes*-Gruppe erfolgten sowohl nach dem gebräuchlichen deutschen Verfahren als auch nach der neueren amerikanischen Methode. Nur wenn es sich um typische *Coli*-Bakterien handelte, stimmten die beiden Verfahren in ihren Ergebnissen miteinander überein. Stämme, die nach dem Ergebnis der *Voges-Proskauer*-, Methylrot- und *Koser*schen Citratprobe zweifellos zu *Bact. coli* gerechnet werden müßten, konnten nach dem Ergebnis der üblichen Untersuchung keineswegs dazu gehören.

Unter 100 isolierten Stämmen befanden sich nur 13 Indolbildner, die zur Prüfung auf die Beständigkeit ihrer Fähigkeit zur Indolbildung 1 Jahr lang in sterilem Leitungswasser gehalten und während dieser Zeit mehrfach untersucht wurden. In zwei Versuchsreihen, von denen die eine bei Zimmertemperatur, die andere bei 30° stand, blieb neben allen übrigen Merkmalen der Organismen auch diese Eigenschaft unverändert. Während die gelbwachsenden Indolbildner bei 30° schon nach 16 Tagen eingegangen waren, hielten die weiß wachsenden typischen *Coli*-Stämme bis zu 370 Tagen im Wasser aus. Auch veränderten sich die Indolbildner in keinem Punkte, wenn sie unter häufigem Umsetzen monatelang auf zuckerreichem eiweißarmen Nährboden fortgezüchtet wurden.

Bei Umwandlungsversuchen an einigen Stämmen durch Erhitzen auf 58 bis 60°, bei denen genau nach den Angaben von *C. Hüttig* (21, 22) verfahren wurde, gelang es nicht, die von diesem Autor angegebene Umwandlung der Bakterien zu erreichen. Dasselbe Ergebnis hatte eine zweite Versuchsreihe, bei der anstatt der zuerst benutzten Wasser-

abschwemmung von Agarkulturen Bouillonkulturen dem Erhitzen unterworfen wurden. Es ergab sich lediglich, daß die Organismen in der Wasserabschwemmung die Einwirkung der Wärme erheblich länger vertrugen als in den Bouillonkulturen. Je älter diese waren, um so geringere Widerstandsfähigkeit zeigten sie gegen das Erhitzen. In 4 Tage alten Kulturen, die 1 Minute lang erwärmt worden waren, fanden sich keine lebenden Keime mehr.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft sprechen wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank für die Bewilligung von Mitteln zur Durchführung der Arbeit aus.

Literatur.

1) *Benecke, W.*, Bau und Leben der Bakterien, S. 209. Berlin, Verlag B. G. Teubner, 1912. — 2) *Blumenberg, W.*, Centralbl. f. Bakt., I. Abt. Orig. **107**, 386, 1928. — 3) *Burke, H. J.* u. *O' D. Gaffney*, J. of Hyg. **182**, 1932.

4) *Demeter, K. I.*, Bakteriologische und biologische Untersuchungsmethoden. Handb. d. Milchwirtsch. v. *W. Winkler* **1**, 1. Teil: „Die Milch", S. 367. Wien, Verlag J. Springer, 1930. — 5) *Desmots, H.*, C. r. des Sciences **188**, 581, 1904. — 6) *Diénert, C.*, Annales d' hyg. publ. **1**, 147, 1923. — 7) *den Dooren de Jong, L. E.*, Centralbl. f. Bakt., I. Abt. Orig. **120**, 1, 1931. — 8) *Duggeli, M.*, ebenda II. Abt. **18**, 200, 1904.

9) *Elion, L.*, Biochem. Zeitschr. **169**, 471, 1926. — 10) *Derselbe*, ebenda **171**, 40, 1926.

11) *Fabry, P.*, C. r. soc. de biol. **1**, 208, 1922 (ref. Chem. Centralbl. **1922**, I, 982). — 12) *Fischer, A.*, Biochem. Zeitschr. **70**, 105, 1915. — 13) *Fuhrmann, F.*, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **19**, 117, 1907.

14) *Geilinger, H.*, Über coliartige Mehlbakterien, ref. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **65**, 419, 421, 423, 1925. — 15) *Gersbach, A.*, ebenda I. Abt. **88**, 412, 1923. — 16) *Grimbert, L.*, C. r. des Sciences **82**, 706, 1901.

17) *Hadley, Ph.*, Science **75**, 665, 1932. — 18) *Hausam, W.*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **82**, 103, 1930/31. — 19) *Holliger, W.*, ebenda II. Abt. **9**, 400, 1902. — 20) *Horowitz-Wlassowa, L. M.* u. *C. A. Rodionowa*, ebenda II. Abt. **87**, 333, 1933. — 21) *Huttig, C.* ebenda II. Abt. **84**, 231, 1931. — 22) *Derselbe*, Milchwirtsch. Forschungen **12**, 455, 1932. — 23) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. **126**, 583, 1932.

24) *Kessler, M. A.* u. *J. C. Swenarton*, J. Bact. **14**, 47, 1927; zit. nach *I. E. Minkewitsch*, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. **125**, 125, 1932. — 25) *Klieneberger, E.*, ebenda I. Abt. Orig. **112**, 354, 1929. — 26) *Derselbe*, ebenda I. Abt. Orig. **126**, 278, 1932. — 27) *Klimmer, M.*, *H. Haupt*, u. *F. Borchers*, Milchwirtsch. Forsch. **9**, 236, 1930. — 28) *Klimmer, M.*, *H. Haupt* u. *R. Roots*, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. **111**, 207, 1929. — 29) *Kluyver, A. J.*, *H. J. L. Donker* u. *F. Vissert 't Hooft*, Biochem. Zeitschr. **161**, 361, 1925. — 30) *Koch, R.*, Wochenschr. f. Brauerei **49**, Nr. 14/15, 111—113. — 31) *Kopp, R.*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **71**, 269, 1927. — 32) *Koser, S. A.*, J. of Bact. **8**, 493, 1923. — 33) *Kovács, N.*, Sitzungsberichte der Wiener Gesellschaft für Mikrobiologie über die Tagung vom 25. November 1927. Centralbl. f. Bakt. I. Abt., Referate, **88**, 1928. — 34) *Kuhn, P.* u. *K. Stern-*

berg, ebenda I. Abt. Orig. **121**, 121 u. 126, 1931. — 35) *Kulp, L. W.*, J. Bact. **24**, 317, 1932.

36) *Lehmann, H.* u. *H. J. Jusatz*, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. **124**, 41, 1932. — 37) *Lehmann, K. B.* u. *R. O. Neumann*, Bakteriologische Diagnostik **2**, Text, *Lehmanns* med. Handatlanten **10/2**. 7. Aufl., München, Verlag I. F. Lehmann, 1927. — 38) *Levy, F.*, Arch. f. Hyg. **49**, 62, 1904. — 39) *Lindsay, G. A.* u. *C. M. Meckler*, North Dakota Agric. Exper. Sta. I. Bact. (Balt) **28**, 115, 1932 (ref. Bied. Centralbl. Jahrg. **63**, N. F. **4**, Heft 1/3, 118, 1933). — 40) *Löweneck, M.*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **87**, 44, 1932.

41) *Maulhardt, H.*, diese Zeitschr. **1**, 165, 1930. — 42) *Minkewitsch, I. E.*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **78**, 339, 1928. — 43) *Derselbe*, Zeitschr. f. Hyg. **111**, 180, 1930. — 44) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. **124**, 169, 1932. — 45) *Monias*, nach *Lehmann* u. *Neumann* (37), S. 438.

46) *Neisser, M.*, Klin. Wochenschr. 1932, S. 1388. — 47) *Neuberg, C.* u. *G. Gorr*, Ergebn. d. Physiol. **24**, 191, 1925. — 48) *Neuberg, C.* u. *E. Reinfurth*, Biochem. Zeitschr. **148**, 553, 1923. — 49) *Niel, C. B. van, A. J. Kluyver* u. *H. G. Derx*, ebenda **210**, 234, 1929. — 50) *Nungester, I. W.* u. *S. A. Anderson*, J. Infect. Dis. **49**, 455, 1931.

51) *Péré, A.*, Ann. de l'Institut Pasteur **10**, 471, 1896. — 52) *Pesch, K.*, Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. **111**, 171, 1929.

53) *Ruckhoff, C. C., I. C. Kallas, B. Chinn* u. *C. W. Coulter*, J. of Bact. **22**, 125, 1931.

54) *Salle, A. I.*, ebenda **20**, 381, 1930. — 55) *Schmalfuss, H.* u. *H. Barthmeyer*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **176**, 282, 1928. — 56) *Sieke, F.* u. *P. Keim*, Arch. f. Hyg. **100**, 44, 1928. — 57) *Standard Methods of Water-Analysis*, American Public Health Association 1925, S. 103, 111.

58) *Tresh, M.* u. *C. Beale*, Surveyor **68**, 579, 1925.

59) *Voges, F.* u. *B. Proskauer*, Zeitschr. f. Hyg. **28**, 20, 1898. — 60) *Virtanen, A. I.*, Annales Academiae Scientiarum Fennicae Serie A. Tom XXXVI, Nr. 11.

61) *Werkman, C. H.*, J. of Bact. **20**, 123, 1930.

(Aus dem Institut für Physikalische Chemie und aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Untersuchungen über die Citronensäuregärung bei Aspergillus niger[1].

Von

W. Schwartz und **Hans Lang.**

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 30. März 1934.)

I. Einleitung.

Die Bildung von Citronensäure durch Pilze hat als erster 1893 *Wehmer* beschrieben (1). Er beobachtete sie bei *Citromyces Pfefferianus* und *Citromyces glaber*, später auch bei *Penicillium luteum* und *Mucor piriformis* (2). Die zu größerer Bedeutung gelangte Entstehung der Säure in Kulturen von *Aspergillus niger* gab zuerst *Zahorski* (3) in einem amerikanischen Patent an (1913), während *James N. Currie* die erste ausführliche Untersuchung darüber 1917 veröffentlichte (4). Er fand, daß eine gut ausgewählte Kultur von *Aspergillus niger* jeder *Citromyces*-Kultur überlegen ist, was auch *Wehmer* bestätigte (5). *Currie* stellte fest, daß *Aspergillus niger*, der bis dahin nur als Oxalsäurebildner bekannt war, auf Zuckerlösungen mehr Citronensäure als Oxalsäure bildet. Er ist der Ansicht, daß für die Gärung eine möglichst einfache Nährlösung, die nur die Elemente Kohlenstoff, Stickstoff, Kalium, Magnesium, Phosphor und Schwefel in Form von geeigneten Verbindungen enthält, vorteilhaft ist. Zugesetzte Reizstoffe, wie Zinksalze, stimulieren nach seiner Meinung wohl das Pilzwachstum, aber nicht die Säurebildung. Im Gegensatz zu *Wehmer*, der seinen Kulturen zur Neutralisation der entstehenden Säure von vornherein Calciumcarbonat zusetzte, erzielte *Currie* bei Abwesenheit des Neutralisationsmittels höhere Ausbeuten an Citronensäure als bei Gegenwart desselben. Außerdem geht nach seiner Erfahrung die Gärung im sauren Medium rascher vor sich als in einem mit Calciumcarbonat neutralisierten. Nach *Currie* enthält die für die Citronensäuregärung mit *Aspergillus niger* geeignetste Lösung im Liter: 125 bis 150 g Saccharose, 2,0 bis 2,5 g NH_4NO_3, 0,75 bis 1,0 g KH_2PO_4, 0,20 bis 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$, 5 bis 4 ccm n/5 HCl; p_H etwa 3,4. Da sie im folgenden oft erwähnt werden muß und für die ersten Versuche verwendet wurde, sei sie kurz als Lösung I bezeichnet.

Außer den grundlegenden Forschungen von *Wehmer* und *Currie* ist noch eine große Anzahl von Arbeiten über die Bildung von Citronensäure durch Pilze erschienen. Sie sind bis zum Jahre 1932 zusammengestellt und besprochen von *K. Bernhauer* (6). Daher werden sie hier nicht einzeln angeführt, sondern nur, soweit sie die eigenen Untersuchungen berühren, im Zusammenhang herangezogen.

[1] Herrn Prof. Dr. *G. Bredig* sprechen wir für Anregung und Förderung aufrichtigen Dank aus.

Die Mehrzahl der erschienenen Arbeiten befaßt sich mit der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der zu vergärenden Lösung. Über die Art der Pilzzüchtung, sowie die damit in Zusammenhang stehende Reproduzierbarkeit der Gärversuche sind in der Literatur wenig positive Angaben zu finden. Jedoch wird wiederholt darauf hingewiesen, daß die einzelnen Pilzarten und -rassen in bezug auf ihr Vermögen der Citronensäurebildung stark variieren und weitgehend entarten können, eine Erscheinung, die der technischen Durchführung der Citronensäuregärung große Schwierigkeiten bereitet. In der Patentliteratur werden an einer Stelle (7) Maßnahmen beschrieben, die eine Entartung des Pilzes verhindern sollen. Sie bestehen in der Trennung von Züchtung und Gärung. Die Züchtung erfolgt recht umständlich auf verschieden zusammengesetzten Substraten, und erst nach einer Reihe von etwa zwölf aufeinanderfolgenden Generationen erhält man Konidien, die zum Ansetzen einer Gärung geeignet sind.

Vorliegende Arbeit untersucht zunächst die Vergärung der von *Currie* angegebenen Lösung bei Züchtung des Pilzes auf Citrone und prüft dann besonders die Durchführbarkeit von Züchtung und Gärung auf ein und demselben Substrat. Dazu ist eine Nährlösung erforderlich, die für die Gärung günstig ist, und die außerdem eine Entartung des Pilzstammes verhindert. Die Ermittlung einer solchen Lösung, sowie einer geeigneten Arbeitsweise ist die Hauptaufgabe der folgenden Untersuchungen. Vorangestellt ist die Ausarbeitung einer Methode zur Bestimmung der Citronensäure in den vergorenen Lösungen.

II. Chemisch-analytische Methode.

Bei der Bestimmung der Citronensäure in den Gärsubstraten ist zu berücksichtigen, daß als Nebenprodukt der Gärung Oxalsäure entstehen kann. Es ist deshalb eine Methode zur exakten quantitativen Trennung und Bestimmung der beiden Säuren in den vergorenen Lösungen unerläßlich. Die bisher angegebenen analytischen Methoden sind aber, besonders in bezug auf die Citratbestimmung, noch recht mangelhaft. So arbeitete *Wüstenfeld* mit einem Fehler von 8 bis 10% (8). *Amelung* (9) benutzte zwei verschiedene Methoden und gibt für die eine einen Verlust von 7 bis 10% Citrat, für die andere einen solchen von 3 bis 5% an. Am brauchbarsten erscheint noch das von *Bernhauer* angegebene Verfahren (10), das auf der verschiedenen Löslichkeit von Calciumoxalat und Calciumcitrat in verdünnten Säuren beruht, die auch schon von *Butkewitsch* (11) zur Analyse benutzt wurde. Nach *Bernhauer* beträgt der Fehler der Citronensäurebestimmung bei Abwesenheit von Oxalsäure etwa 4% und kann bei deren Vorhandensein noch größer werden. Da diese Ergebnisse nicht befriedigend sind, wurden zunächst die günstigsten Bedingungen für die Citratbestimmung genauer festgelegt und, nachdem diese mit einer Genauigkeit von 1,5% ausgeführt werden konnte, die Trennung des Calciumoxalats vom Citrat untersucht.

Nach einer Reihe von Analysen wurde für die Citronensäurebestimmung (nach bereits erfolgter Entfernung der Oxalsäure) an folgender Arbeitsweise

festgehalten, die sich von der *Bernhauers* nur durch die Behandlung des Niederschlages und durch genauere Angabe zu beachtender Umstände unterscheidet:

Die mit einem Überschuß von Chlorcalcium versetzte citronensäurehaltige Lösung wird auf dem Wasserbad auf 8 bis 10 ccm eingedampft, mit Ammoniak in der Hitze tropfenweise neutralisiert (bis zur schwachen Gelbfärbung von Methylrot) und weiter erhitzt, bis sich das gesamte allmählich ausfallende Calciumcitrat kristallinisch am Boden des Gefäßes absetzt, was je nach der Menge des vorhandenen Zuckers 15 bis 30 Minuten dauern kann (Zucker verzögert die Kristallisation). Meist schlägt inzwischen der Indikator wieder in Rot um, und man muß noch einige Male einen Tropfen Ammoniak zusetzen. Dann wird heiß und rasch filtriert, mit höchstens 10 ccm heißem Wasser und schließlich mit etwa 60 %igem Alkohol gewaschen. Der Niederschlag wird getrocknet, verascht, dann in überschüssiger n/10 Salzsäure gelöst. Die Lösung wird zur vollständigen Entfernung der Kohlensäure zum Kochen erhitzt und mit n/10 Natronlauge zurücktitriert. Es ist unzweckmäßig, das Calciumcitrat gravimetrisch zu bestimmen, da es sein Kristallwasser sehr schwer vollständig abgibt.

Bei vier exakt nach obiger Vorschrift ausgeführten Analysen war der größte Fehler 1,53 %:

Zur Analyse gebrachte Citronensäure	0,1825 g
gefundene „	0,1797 g
Fehler	0,0028 g

Die Bedingungen der quantitativen Trennung von Oxalsäure und Citronensäure, d. h. die Beschaffenheit der Analysenprobe, bei welcher das Calciumoxalat quantitativ gefällt und das Citrat vollständig in Lösung sein soll, definiert *Bernhauer* lediglich durch Angabe des Gehaltes an freier Säure in Prozenten. Das ist nicht ganz ausreichend. Von größerer Bedeutung als der Prozentgehalt an freier Säure ist die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung. Diese hängt aber nicht nur von der Menge der vorhandenen Säure ab, sondern auch von dem Mengenverhältnis der Oxalsäure zur Citronensäure und der Menge und Art der vorhandenen Neutralsalze. Diese wechseln in den zu analysierenden Gärproben. Außerdem ist für die quantitative Abscheidung des Calciumoxalates aus saurer Lösung der vorhandene Überschuß an Calciumionen von großer Bedeutung. Es wurde daher der p_H-Bereich festgelegt, innerhalb dessen die Trennung bei einem bestimmten Überschuß an Chlorcalcium quantitativ möglich ist.

Folgender Arbeitsgang erwies sich als zweckmäßig:

Die Analysenprobe, deren Volumen je 0,1 g Oxalsäure etwa 40 ccm betragen soll, wird in den p_H-Bereich 1,5 bis 2,5 gebracht, auf dem Wasserbad erhitzt und mit 10 ccm heißer 10 %iger Chlorcalciumlösung versetzt. Das p_H der Lösung soll nach der Fällung nicht unter 1,2 liegen, da sonst merkliche Mengen Oxalat in Lösung bleiben. Nach 24 Stunden wird durch ein engporiges Filter (z. B. *Schleicher & Schüll* „Blauband") filtriert, der Niederschlag mit kaltem Wasser gewaschen und wie üblich mit Permanganat die Oxalsäure bestimmt. Das Filtrat wird am Wasserbad auf etwa 10 ccm eingeengt und zur Bestimmung der Citronensäure, wie oben ausführlich beschrieben, weiterbehandelt.

Die Gegenwart von Zucker, Gluconsäure, Magnesiumsalzen und Phosphaten beeinträchtigt in den für Nährlösungen in Betracht kommenden Mengen das Analysenergebnis nicht über die angegebene Fehlergrenze hinaus.

Beispiel. Bestimmung der Citronensäure und Oxalsäure bei Anwesenheit von Gluconsäure und der von *Currie* (siehe S. 387) angegebenen Nährstoffe:

Vorhandene Oxalsäure:	0,1036 g	Vorhandene Citronensäure:	0,1825 g
Gefundene Oxalsäure:	0,1032 g	Gefundene Citronensäure:	0,1835 g
Fehler:	— 0,0004 g	Fehler:	+ 0,0010 g
Vorhandene Oxalsäure:	0,1036 g	Vorhandene Citronensäure:	0,1825 g
Gefundene Oxalsäure:	0,1032 g	Gefundene Citronensäure:	0,1815 g
Fehler:	— 0,0004 g	Fehler:	— 0,0010 g

III. Methodik der Gärversuche.

Die Gärversuche wurden als Oberflächengärung im allgemeinen auf je 100 ccm Lösung in 300 ccm fassenden *Erlenmeyer*-Kolben angesetzt. Die Schichthöhe der Flüssigkeit betrug dabei 2 cm. Gäransätze auf 500 ccm Lösung verliefen bei derselben Schichthöhe ebenso. Eine 3 cm hohe Flüssigkeitsschicht (150 ccm im 300-ccm-Kolben) ergab dagegen schlechtere Ausbeute an Citronensäure, z. B.:

Kolbengröße ccm	Volumen der Flüssigkeit ccm	Schichthöhe cm	Ausbeute an Citronensäure, bezogen auf angewandten Zucker %
300	100	2	40,0
300	150	3	33,3

Die Kolben waren durch Wattestopfen verschlossen. Die Aussaat der Konidien auf die durch halbstündiges Erhitzen bei 100° sterilisierten Lösungen erfolgte mit Hilfe einer Platinöse. Es erwies sich als zweckmäßig, die Saat so reichlich zu bemessen, daß sie gleichmäßig über die ganze Flüssigkeitsoberfläche verteilt werden kann. Selbst größere Unterschiede in der ausgesäten Konidienmenge haben dann auf den Verlauf der Citronensäurebildung keinen maßgeblichen Einfluß, wie an Hand von Parallelversuchen mit verschieden großen Einsaaten festgestellt wurde (vgl. S. 396). Die Gärung erfolgte im Thermostaten bei 35° C. Bei dieser Temperatur war, bei Auswahl eines geeigneten Substrates, in 2 bis 3 Tagen nach der Saat eine lückenlose Myceldecke gewachsen.

Den gärenden Lösungen wurden in bestimmten Zeitabständen Proben zur Analyse entnommen und so der Verlauf der Gärung festgelegt. In den Proben (3 ccm) wurden die Wasserstoffionenkonzentration, die gebildete Citronensäure und, wenn nötig, die entstandene Oxalsäure bestimmt.

Für die Berechnung der Ausbeute an Citronensäure ist der im Gärverlauf ermittelte maximale Gehalt der vergorenen Lösung zugrunde gelegt. Dieser ist jedoch nicht allein maßgebend; außer ihm mußte jedesmal die am Ende der Gärung noch vorhandene Menge der Lösung gemessen werden. Von 100 ccm eingebrachter Lösung blieben 65 bis 80 ccm, im Mittel 73 ccm. Die Ausbeute ist immer auf die Menge des angewendeten Zuckers bezogen.

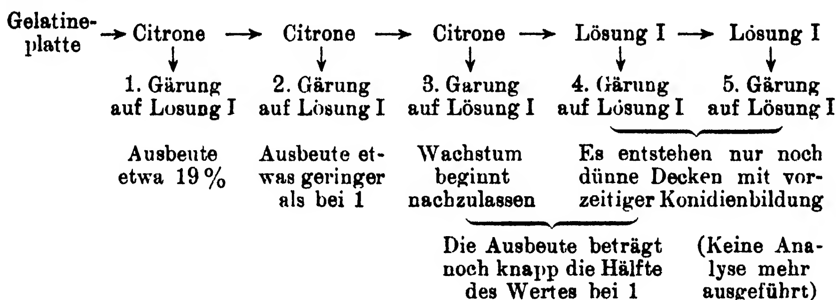
IV. Die Pilzzüchtung unter Erhaltung des Gärvermögens.

Im folgenden wird nicht eine von Anfang an streng durchgeführte und beibehaltene Methode angegeben, sondern der Weg geschildert, der über mehrere Mißerfolge schließlich zu einer Arbeitsweise führte,

welche die Fortzüchtung des Pilzes unter Erhaltung seines Vermögens der Citronensäurebildung ermöglicht.

Zunächst wurde ein von Früchten isolierter *Aspergillus niger* nach den Verfahren von *Koch*[1] und *Lindner*[2] reingezüchtet. Die Reinkultur wurde auf eine unbeschädigte, durch wiederholtes Waschen und Abflammen mit Alkohol sterilisierte Citrone geimpft. Auf dieser bildete der Pilz reichlich Konidien, die zur Aussaat auf das zu vergärende Substrat kamen. Als solches diente zunächst Lösung I. Reproduzierbare Ausbeuten an Citronensäure ergab die Gärung nur, solange die Ausgangskultur noch jung, höchstens etwa 3 Wochen alt war. Mit zunehmendem Alter der Ausgangskultur und ihrer Konidien nahm die Gärkraft der Pilzdecken allmählich ab. Daraus folgte die Notwendigkeit, die auf der Citrone erhaltenen Konidien dauernd zu erneuern. Erfolgte die Weiterzüchtung mehrmals hintereinander von Citrone auf Citrone, so ließ das Wachstum des Pilzes nach, und auch seine Fähigkeit zur Citronensäurebildung verminderte sich.

Zuerst fand also die Züchtung des Pilzes auf Citrone und die Gärung in Lösung I statt. Weiterhin wurde sowohl Züchtung als Gärung mit dieser Lösung vorgenommen. Beide Methoden sind in dem nachstehenden Schema dargestellt.



Es zeigte sich eine bedeutende Verminderung des Säurebildungsvermögens mit zunehmender Entfernung von der ursprünglichen Ausgangskultur, die eine Reinzucht auf Gelatineplatte mit den Nährstoffen der Lösung I war. Nach dreimaliger Fortpflanzung des Pilzes wurde nur noch knapp die Hälfte der nach einmaliger Fortpflanzung erzielten Citronensäuremenge erreicht.

Daraufhin wurde der Pilz wieder auf eine Gelatineplatte geimpft, die dieselben Nährstoffe wie Lösung I enthielt. Nach dieser Zwischenkultur ergab er unter sonst gleichen Bedingungen wie früher wieder verbesserte Citronensäureausbeuten. Daraus geht hervor, daß die

---

[1] Zur Herstellung der *Koch*schen Plattenkultur wurde Lösung I mit Zusatz von 12 % Gelatine verwendet. — [2] Tröpfchenkultur in Lösung I.

Züchtung des Pilzes auf Gelatine enthaltenden Substraten seine Fähigkeit zur Citronensäurebildung günstig beeinflußt.

Von nun an erfolgte die Weiterzüchtung des Pilzes zur dauernden Erzeugung frischer Konidien auf einer Lösung von nachstehender Zusammensetzung: 125 g Saccharose, 2 g NH_4NO_3, 0,75 g KH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4 . 7 H_2O$, 0,5 g $CaCl_2 . 6 H_2O$[1], 1 g Gelatine, 64 ccm m/10 H_3PO_4[1] im Liter; $p_H = 2,5$. Mit ihr konnte das Säurebildungsvermögen über größere Zeitabstände konstant erhalten werden. Sie sei der Einfachheit halber im folgenden immer als „Standardlösung" bezeichnet. Einmalige Zwischenkultur auf Citrone nach einigen Kulturen auf Standardlösung hatte keinen Einfluß auf die Citronensäurebildung. Ebenso rief ein- oder zweimalige Züchtung auf Würzegelatine gegenüber der Kultur auf Standardlösung keinerlei Änderung in dem Säurebildungsvermögens hervor. Die Züchtung der Kulturen erfolgte bis zur genügenden Konidienbildung bei 35° C. Nachher wurden sie bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

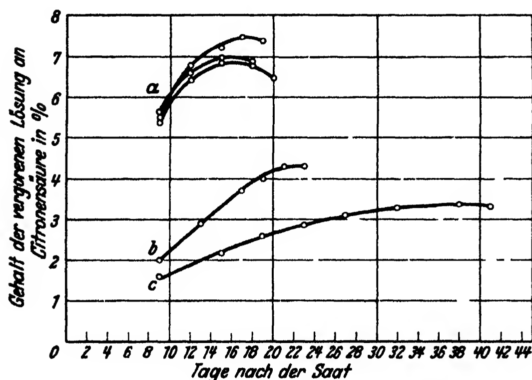


Abb 1.
Verlauf der Citronensäuregärung in Standardlösung. Alter der Ausgangskultur, von der die Konidien stammen: a) 1 bis 3 Wochen (3 Parallelversuche), b) $2^1/_2$ Monate, c) $4^1/_2$ Monate.

Das Ergebnis der Gäransätze erwies sich stark abhängig vom Alter der jeweiligen Ausgangskultur. War diese 1 bis 3 Wochen alt, so ergab sich ein bestimmter normaler Gärverlauf, wie ihn z. B. Abb. 1a in drei Parallelversuchen zeigt. Hatte die Ausgangskultur bei der Abimpfung des Gärversuchs ein Alter von $2^1/_2$ Monaten, so lieferte die Gärung eine viel geringere Citronensäureausbeute als im ersten Fall (Abb. 1b). Wurde von derselben Kultur nach weiteren 2 Monaten wieder auf einen Gäransatz abgeimpft, dann verlief die Säurebildung noch träger und unergiebiger (Abb. 1c).

Die Wiederhochzüchtung der alten Kultur zum ursprünglichen Gärvermögen gelang nach folgendem Schema:

Ausgangskultur → Vorkultur → Vorkultur → Gäransatz.

[1] Die Gegenwart von Calciumchlorid und Phosphorsäure ist wichtig für die Gärung (vgl. S. 395). Hier erfolgten diese Zusätze nur, um Züchtung und Gärung auf dem gleichen Substrat zu ermöglichen.

Bei einem Alter der Ausgangskultur von 1 bis 2 Monaten genügte einmalige Vorkultur, bei höherem Alter war zweimalige Vorkultur notwendig. Die Vorkulturen wurden am besten gleich weitergeimpft, sobald sie reife Konidien in ausreichender Menge gebildet hatten, was meist in 6 bis 9 Tagen der Fall war. Als Substrat waren „Standardlösung“ und Würzegelatine gleich gut geeignet.

Die dauernde Erhaltung der Gärkraft auf gleicher Höhe ist also gewährleistet, wenn dem Pilz stets Gelatine geboten wird, und wenn für jeden Ansatz junge, eben gereifte Konidien benutzt werden.

V. Einfluß von Zusammensetzung und Reaktion der Nährlösung auf den Verlauf der Gärung.

Zahlreiche verschieden zusammengesetzte Nährlösungen wurden für die Citronensäuregärung vorgeschlagen. Die meisten gleichen sich in der qualitativen Zusammenstellung ihrer Hauptbestandteile. Als die günstigste Kohlenstoffquelle ist allgemein Rohrzucker anerkannt. Die bevorzugteste Stickstoffverbindung ist Ammoniumnitrat. Als weitere Nährsalze sind stets Kaliumphosphat und Magnesiumsulfat vorhanden. Die günstigste Zuckerkonzentration, die vorteilhafteste Stickstoffmenge, sowie die Notwendigkeit von Neutralisationsmitteln und Stimulatoren werden von den verschiedenen Autoren sehr ungleich angegeben. Diese Unstimmigkeiten beruhen zum großen Teil auf Verwendung verschiedener Pilzstämme oder, bei Benutzung gleicher Stämme, auf Unterschieden in deren Züchtung.

Unter diesen Umständen wählten wir für die ersten Gärversuche eine möglichst einfache Lösung, wie sie von *Currie* vorgeschlagen worden ist (Lösung I). Außerdem wurde in einigen Vorversuchen die Vergärung reiner Zuckerlösungen ohne Nährsalze mit fertigen Pilzdecken probiert. Da in diesem Fall bedeutend mehr Oxalsäure entstand, arbeiteten wir weiterhin nur noch bei Gegenwart von Nährsalzen.

Lösung I lieferte in einigen Ausnahmefällen Erträge von 28 und 34 % Citronensäure bei ganz geringem Auftreten von Oxalsäure. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar. Im allgemeinen wurde der in der Lösung I vorhandene Zucker nur in 18 bis 25 % Citronensäure umgesetzt. Ferner erwies sich die Lösung insofern als ungeeignet, als sie dem verwendeten Pilz keine gleichmäßige Deckenbildung ermöglichte. Nur auf etwa zwei Drittel der mit ihr angestellten Gäransätze wuchsen vollständige Myceldecken heran, welche die ganze zur Verfügung stehende Oberfläche ausnutzten. Am übrigen Drittel entstanden nur lückenhafte Decken, die nicht vergleichbare Ergebnisse lieferten. Ein Zusatz von 0,05 % Chlorcalcium zu Lösung I gestaltete den Gärverlauf wesentlich günstiger[1], die Deckenbildung aber noch nicht befriedigend.

[1] Siehe S. 395.

Da sich unterdessen Gelatine für die Fortzüchtung des Pilzes und Erhaltung seines Säurebildungsvermögens als vorteilhaft erwiesen hatte, wurde deren Wirksamkeit auch im Gäransatz untersucht. Neben Chlorcalcium erhielt Lösung I zunächst einen Zusatz von 0,2 % Gelatine. Die Säurebildung ging nun bedeutend rascher vor sich; am 9. Tag nach der Saat war bereits doppelt so viel Citronensäure gebildet wie bei Abwesenheit von Gelatine. Noch viel schneller erfolgte jedoch der Abbau der entstandenen Säure; 2 Tage später, also am 11. Tag, waren zwei Drittel und am 13. Tag nach der Impfung die gesamte Citronensäure wieder aufgezehrt, während sie sonst weiter angehäuft und erst nach 20 Tagen oder noch später langsam wieder abgebaut wurde. Die Garansatze ohne Gelatine hatten ein Anfangs-p_H von 3,4. Nach der Deckenbildung, also nach etwa 3 Tagen, war die Wasserstoffionenkonzentration auf $p_H = 2$ gestiegen und erreichte gegen Ende der Gärung den p_H-Wert 1,8. Das p_H des besprochenen Versuchs mit Gelatine war vor Beginn des Pilzwachstums 4,4, sank in 3 Tagen ebenfalls auf den Wert 2, stieg dann aber wieder an, und war am 9. Tag 2,2, am 11. Tag 2,4, am 13. Tag 3 und am 15. Tag 4,5. Das Ansteigen des p_H-Wertes beruht auf der Abspaltung von Ammoniak aus Gelatine durch den Pilz. Nach *Frey* (12) ist für die Citronensäurebildung durch *Aspergillus niger* $p_H = 2$ am günstigsten.

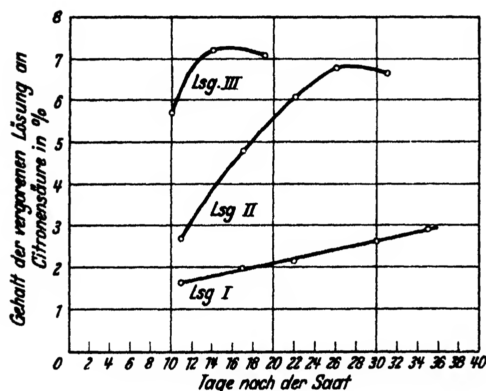


Abb. 2.
Wirkung von Chlorcalcium- und Gelatine-Phosphorsäure-Zusätzen auf den Gärungsverlauf. (Zusammensetzung der Losungen siehe Text.)

Wurde nun von vornherein eine größere Menge Mineralsäure zugesetzt, so blieb die durch die Gelatine bewirkte Beschleunigung der Citronensäurebildung erhalten, jedoch ließ sich das Absinken der Wasserstoffionenkonzentration und die anscheinend damit verbundene rasche Aufzehrung der entstandenen Citronensäure verhindern. Auf allen Kulturen mit Gelatinezusatz bildeten sich vollständige, lückenlose Myceldecken aus.

Abb. 2 zeigt den Gärverlauf von Parallelversuchen mit folgenden bereits besprochenen Lösungen:

	Lösung I (nach *Currie*)	Lösung II	Lösung III (Standardlösung)
Saccharose	125 g/Liter	125 g/Liter	125 g/Liter
NH_4NO_3	2 „	2 „	2 „
KH_2PO_4	0,75 „	0,75 „	0,75 „
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,20 „	0,20 „	0,20 „
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	—	0,5 „	0,5* „
Gelatine	—	—	1,0 „
m/10 HCl	4 ccm/Liter	4 ccm/Liter	—
m/10 H_3PO_4	—	—	64 ccm/Liter
p_H	3.4	3.4	2.5

Die Ausbeute an Citronensäure war

bei Lösung	I:	18 %	in 35 Tagen
„ „	II:	41,5 %	„ 26 „
„ „	III:	45 %	„ 14 „

In Lösung III konnte statt Phosphorsäure mit gleichem Erfolg Schwefelsäure benutzt werden. Bei Verwendung von Salzsäure, ebenso von Salpetersäure, war der Ertrag um 4 % geringer. An Stelle von 2 g Ammoniumnitrat führten 1,65 g Ammoniumsulfat zum gleichen Ergebnis.

Die günstige Wirkung der Gelatine auf den Verlauf der Gärung äußerte sich nur im Verein mit einer der üblichen Stickstoffverbindungen (z. B. Ammoniumnitrat oder Ammoniumsulfat). War sie als einzige Stickstoffquelle zugegen, 0,2 % in einer sonst wie III zusammengesetzten Nährlösung, ohne Ammonnitrat, so kam nur eine träge Citronensäurebildung zustande, z. B. mit einer Ausbeute von 31,5 % in 27 Tagen.

Die Gärung auf Standardlösung ergab gewöhnlich 40 bis 45 % Citronensäure und bis zu 0,7 % Oxalsäure, bezogen auf angewandten Zucker. Bei Veränderung der Zuckerkonzentration über oder unter 125 g/Liter war die Ausbeute ungünstiger, z. B. bei

50 g Saccharose/Liter:	21,5 %	Citronensäure
75 g „	31,7 %	„
100 g „	40,2 %	„
125 g „	44,1 %	„
150 g „	36,8 %	„

VI. Reproduzierbarkeit und Vergleich der Gärversuche.

Nach Ermittlung einer geeigneten Züchtungsmethode[1] sowie einer brauchbaren Nährlösung[2] konnte der Gärverlauf gewöhnlich mit Ausbeuteschwankungen bis zu 5 % wiederholt werden. In zwei Ausnahmefällen, innerhalb von 14 Wiederholungen desselben Versuchs, zeigten sich bei gleichen Bedingungen größere Unterschiede; es wurden statt der zu erwartenden 40 bis 45 % Citronensäure (bezogen auf an-

[1] Siehe S. 393. — [2] Lösung III (Standardlösung).

gewandten Zucker) nur 34 % gebildet. Bei einem Versuch erreichte der Ertrag den Wert von 47 %. Die Gärdauer vom Tag der Saat bis zum beginnenden Abbau der erzeugten Citronensäure schwankte zwischen 9 und 18 Tagen, im Mittel war sie 14 Tage. Die Wiederholungen wurden zu verschiedenen Zeiten nach dem ursprünglichen Versuch, die letzte nach 11 Monaten und zehnmaliger Überimpfung der Stammkultur ausgeführt.

Bei drei Parallelversuchen war die größte Abweichung in der Ausbeute 3,5 %. Der zeitliche Gärverlauf wies nur geringe Verschiedenheit auf (vgl. Abb. 1a).

Kleine Unterschiede in der Menge der ausgesäten Konidien, wie sie beim Impfen mit der Platinöse unvermeidlich sind, verursachen keine Unterschiede in der Säurebildung. Selbst Parallelversuche, bei welchen die Konidien im Mengenverhältnis 1 : 2 : 3 : 4 eingebracht waren, zeigten keine wesentliche Beeinflussung der Säurebildung durch die Einsaatgröße (Abb. 3).

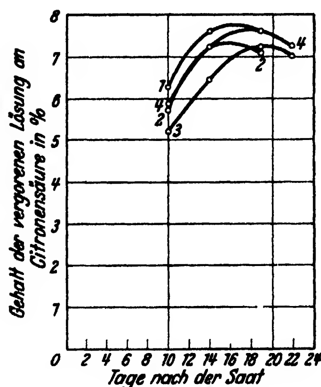


Abb. 3.
Verlauf der Citronensäuregärung bei verschieden starken Einsaaten. (Die Bezifferung der Kurven entspricht der Einsaatmenge, vgl. hierzu auch die Parallelversuche mit gleicher Einsaatmenge in Abb. 1 a.)

Infolge der Verschiedenheiten im Gärverlauf von Ansätzen, die nicht gleichzeitig von derselben Kultur abgeimpft sind, muß bei Untersuchung der Wirkung einer neuen Bedingung oder eines neuen Lösungsbestandteiles stets ein Kontrollversuch bei bereits erprobten Bedingungen mitgeführt werden. Einzelne Versuche aus verschiedenen Reihen, die nicht gleichzeitig von derselben Ausgangs- oder Vorkultur abgeimpft sind, können nur dann unmittelbar miteinander verglichen werden, wenn die Kontrollversuche beider Reihen gleich verlaufen.

VII. Gärversuche mit Giftzusätzen.

Die Erwägung der Möglichkeit, daß gewisse Stoffe die Veratmung des Zuckers zu Kohlensäure sowie seine Verwendung zum Aufbau des Pilzkörpers verringern und damit einen größeren Anteil des Zuckers zur Erzeugung von Citronensäure freigeben könnten, veranlaßte den Zusatz von Giften zu den Göransätzen. Als solche wurden Arsen- und Antimonverbindungen, Chloroform und Cyankali verwendet.

1. Versuche mit Arsen- und Antimonverbindungen.

Bei einigen Gärversuchen, die von einer alten, nicht genügend hochgezüchteten Ausgangskultur abgeimpft waren, bewirkte die Zugabe bestimmter Mengen arseniger Säure zur Standardlösung eine merkliche

Anregung der Citronensäurebildung im Vergleich zu den Parallelansätzen auf unvergifteter Standardlösung (Tabelle I). Bei den Ansätzen 3 bis 6 befand sich die arsenige Säure schon vor der Aussaat des Pilzes in den Versuchslösungen. Bei den Ansätzen 7 bis 10 wurde sie erst nach der Entstehung eines feinen Pilzhäutchens zugesetzt.

Tabelle I.

Versuchsreihe mit arseniger Säure.

Gärdauer in Tagen	9 g/100 ccm	15 g/100 ccm	19 g/100 ccm
Gebildete Citronensäure in			
1. unvergifteter Lösung III	2,13	2,88	3,27
2. „ „	2,24	3,62	3,65
3. Lösung III + 0,100 g As_2O_3/100 ccm	3,91	5,51	5,08
4. „ + 0,010 g As_2O_3/100 ccm	3,11	3,12	2,39
5. „ + 0,005 g As_2O_3/100 ccm	3,67	3,80	3,86
6. „ + 0,001 g As_2O_3/100 ccm	2,24	2,60	2,64
7. „ + 0,100 g As_2O_3/100 ccm	1,49	4,18	4,80
8. „ + 0,010 g As_2O_3/100 ccm	4,09	4,35	4,39
9. „ + 0,005 g As_2O_3/100 ccm	2,49	3,58	3,94
10. „ + 0,001 g As_2O_3/100 ccm	2,54	3,58	3,97

Bei den Konzentrationen von 0,100 g As_2O_3/100 ccm ist eine deutliche Beschleunigung der Citronensäurebildung gegenüber den Vergleichskulturen vorhanden. Die auf angewandten Zucker bezogene Ausbeute ist bei

Versuch	1	in	19 Tagen	20,4 %	Citronensäure
„	2	„	19 „	23,3 %	„
„	3	„	15 „	32,1 %	„
„	7	„	19 „	28,4 %	„

Während bei sämtlichen obigen Gärversuchen vollständige Pilzdecken heranwuchsen, kam es bei mehreren Wiederholungen des Versuchs 3 nur zu ungenugender Deckenbildung. 0,1 % As_2O_3 scheint also bei Zugabe vor der Impfung annähernd die Grenze der erträglichen Arsenkonzentration zu sein.

In der folgenden Versuchsreihe mit Kaliumarsenit und Kaliumantimonyltartrat (Tabelle II) waren die Gifte ebenfalls vor der Einsaat des Pilzes in der Lösung vorhanden. 0,1 g As_2O_3 sind im Arsengehalt äquivalent 0,24 g K_3AsO_3.

In Versuch 2 mit 0,06 % Kaliumarsenit ist im Vergleich zum unvergifteten Ansatz eine anfängliche Beschleunigung der Citronensäurebildung zu erkennen. Die auf angewandten Zucker bezogene maximale Ausbeute ist in

Versuch	1	nach	12 Tagen	34,2 %	Citronensäure
„	2	„	9 „	34,8 %	„

Tabelle II.

Versuchsreihe mit Kaliumarsenit und Kaliumantimonyltartrat.

Gärdauer in Tagen:	9 g/100 ccm	12 g/100 ccm	15 g/100 ccm
Gebildete Citronensäure in			
1. unvergifteter Lösung III	5,95	6,40	5,25
2. Lösung III + 0,060 g K_3AsO_3 in 100 ccm	6,60	6,08	4,82
3. „ + 0,120 g K_3AsO_3 in 100 ccm	6,19	6,08	5,06
4. „ + 0,240 g K_3AsO_3 in 100 ccm	5,28	5,86	5,02
5. „ + 0,480 g K_3AsO_3 in 100 ccm	ungenügende Mycelbildung		
6. „ + 0,003 g K(SbO)-Tartrat in 100 ccm	5,30	5,75	4,85
7. „ + 0,033 g K(SbO)-Tartrat in 100 ccm	5,58	6,06	5,40
8. „ + 0,333 g K(SbO)-Tartrat in 100 ccm	ungenügende Mycelbildung		

Etwas günstiger verlief die nächste Versuchsreihe mit Zusatz von Kaliumarsenat vor der Aussaat des Pilzes (Tabelle III). 0,18 g KH_2AsO_4 entsprechen im Arsengehalt 0,1 g As_2O_3. Die Versuche mit Arsenverbindungen zeigen, daß jeder der drei Zusätze in einer bestimmten Konzentration die Citronensäurebildung etwas anregt. Jedoch ist der Einfluß, gemessen an den normalen Versuchsschwankungen, zu gering, um den Schluß auf einen veränderten Stoffwechsel des Pilzes zuzulassen. Kaliumantimonyltartrat zeigt in kleinen Konzentrationen kaum eine Wirkung. In größeren Konzentrationen verhindert es, wie auch die Arsenverbindungen, ein ausreichendes Pilzwachstum.

2. Versuche mit Chloroform.

Chloroform übt in Konzentrationen bis etwa 0,8 Vol.-% keinen Einfluß auf die Gärung aus. In höheren Konzentrationen wirkt es verzögernd auf die Säurebildung und verursacht eine Verschlechterung der Ausbeute (Tabelle IV).

3. Versuche mit Kaliumcyanid[1].

Die Zusammenstellung der Ansätze mit Cyankali zeigt eine allmähliche Abnahme der Ausbeute an Citronensäure mit zunehmender Konzentration des Giftes (Tabelle V). Beachtenswert ist ferner eine Verzögerung des Wachstumsbeginns und damit auch des Einsetzens der Gärung um

1 Tag	bei	0,01 g KCN/100 ccm		
$2^1/_2$ Tage	„	0,02 g KCN/100	„	
3 „	„	0,04 g KCN/100	„	
8 „	„	0,08 g KCN/100	„	(0,012 Mol/Liter)

[1] *Haehn* (13) gibt bei Versuchen mit *Citromyces* eine Steigerung der Ausbeute an Citronensäure um etwa 16% an durch Zusatz von 0,08 g KCN zu 1480 ccm zu vergärender Lösung (d. i. 0,0054 g KCN/100 ccm).

Tabelle III. Versuchsreihe mit Kaliumarsenat.

Gärdauer in Tagen	10 g/100 ccm	12 g/100 ccm	14 g/100 ccm	16 g/100 ccm	18 g/100 ccm
Gebildete Citronensäure in					
1. unvergifteter Lösung III	5,30	5,73	6,06	6,32	6,44
2. Lösung III + 0,09 g KH_2AsO_4/100 ccm	6,04	6,60	7,12	7,10	
3. „ + 0,135 g KH_2AsO_4/100 ccm	6,46	7,22	7,62	7,14	
4. „ + 0,18 g KH_2AsO_4/100 ccm	5,75	6,80	7,21	7,10	6,48
5. „ + 0,36 g KH_2AsO_4/100 ccm	ungenügendes Wachstum				

	Ausbeute an vergorener Lösung von 100 ccm angesetzter Lösung ccm	Ausbeute an Citronensäure bezogen auf angewandten Zucker %		Ausbeute an vergorener Lösung von 100 ccm angesetzter Lösung ccm	Ausbeute an Citronensäure bezogen auf angewandten Zucker %
Versuch 1	77,5	40,0 in 18 Tagen	Versuch 3	74,0	45,1 „ 14 Tagen
„ 2	77,0	43,8 „ 14 „	„ 4	72,0	41,5 „ 14 „

Tabelle IV Versuchsreihe mit Chloroform

Gärdauer in Tagen	7 g/100 ccm	9 g/100 ccm	10 g/100 ccm	11 g/100 ccm	12 g/100 ccm	14 g/100 ccm	15 g/100 ccm	18 g/100 ccm	21 g/100 ccm	24 g/100 ccm
Gebildete Citronensäure in										
1 unvergifteter Lösung III	5,35	6,62		6,88		5,76				
2. Lösung III + 0,02 ccm $CHCl_3$/100 ccm	5,15	6,16		6,44		5,52				
3. „ + 0,05 „	5,86	6,75		6,46		6,02				
4. „ + 0,125 „	5,82	6,78		6,58						
5 „ + 0,312 „	6,52	7,16		6,93						
6. „ + 0,78 „	5,82	6,86		6,71						
7. „ + 1,17 „	2.26		5,44		6,04		5,24			
8. „ + 1,755 „			1,70		2,62		3,92	5,10	5,38	4,84

	Ausbeute an vergorener Lösung von 100 ccm angesetzter Lösung ccm	Ausbeute an Citronensäure bezogen auf angewandten Zucker %		Ausbeute an vergorener Lösung von 100 ccm angesetzter Lösung ccm	Ausbeute an Citronensäure bezogen auf angewandten Zucker %
Versuch 1	77	42,4	Versuch 5	74,5	42,6
„ 2	75	39,9	„ 6	72	39,5
„ 3	71	39,5	„ 7	75	36,2
„ 4	73	39,5	„ 8	67	28,8

Tabelle V. Versuchsreihe mit Kaliumcyanid.

Gärdauer in Tagen	7 g/100 ccm	9 g/100 ccm	10 g/100 ccm	11 g/100 ccm	12 g/100 ccm	14 g/100 ccm	17 g/100 ccm	19 g/100 ccm
Gebildete Citronensäure in								
1. unvergifteter Losung III	6,62	7,48		7,26				
2. Losung III + 0,0012 g KCN/100 ccm	5,84	6,69		6,91		5,79		
3. „ + 0,0025 g KCN/100 ccm	6,71	7,66		7,43				
4. „ + 0,005 g KCN/100 ccm	6,37	7,43		7,12				
5. „ + 0,01 g KCN/100 ccm	6,16	7,04		7,22		6,25		
6. „ + 0,02 g KCN/100 ccm	3,47		6,98		6,69			
7. „ + 0,04 g KCN/100 ccm	2,13		6,42		6,31			
8. „ + 0,08 g KCN/100 ccm						3,90	6,37	5,65

	Ausbeute an vergorener Losung von 100 ccm angesetzter Losung ccm	Ausbeute an Citronensäure bezogen auf angewandten Zucker %		Ausbeute an vergorener Losung von 100 ccm angesetzter Losung ccm	Ausbeute an Citronensäure bezogen auf angewandten Zucker %
Versuch 1	79	47,3	Versuch 5	79	44,8
„ 2	76	42,0	„ 6	74,5	41,3
„ 3	77,5	47,5	„ 7	74	38,0
„ 4	79	46,9	„ 8	79,5	40,5

Zu erwähnen ist noch, daß bei Versuch 8 mit 0,08 g KCN/100 ccm zur Vermeidung eines zu hohen Kaligehaltes und zwecks Erhaltung der sauren Reaktion der Lösung das zur Zusammensetzung der Standardlösung gehörige Kaliumphosphat durch die aquivalente Menge Phosphorsäure ersetzt war.

4. Ergebnis der Gärversuche mit Giftzusatzen.

Ein durch Verwendung alter Konidien verursachter unergiebiger Garverlauf mit nur 23 % Ausbeute wurde durch Zugabe von 0,1 % arseniger Säure verbessert, so daß er einen Ertrag von 32 % Citronensaure ergab. Der normale Umsatz des in der Standardlosung gebotenen Zuckers zu 40 bis 45 % Citronensäure konnte durch den Zusatz von Giften nicht gesteigert werden.

VIII. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Die auch von *Butkewitsch* und *Bernhauer* angewendete Trennung der Citronensäure und Oxalsäure auf Grund der verschiedenen Löslich-

keit ihrer Calciumsalze wurde zu einer exakten Analysenmethode ausgearbeitet.

2. Die Züchtung des verwendeten *Aspergillus niger* auf Citrone bewirkt eine starke Verminderung seiner Fähigkeit zur Citronensäurebildung. Diese kann wieder gesteigert werden durch Kultur auf Gelatine enthaltenden Nährböden.

3. Die Gärkraft einer Pilzdecke ist abhängig vom Alter der zu ihrer Erzeugung benutzten Konidien. Durch Verwendung junger, eben gereifter Konidien, die auf gelatinehaltigen Substraten gezüchtet worden sind, kann das Gärungsvermögen des Pilzes konstant erhalten werden.

4. Durch Zusatz von Chlorcalcium zu der von *Currie* vorgeschlagenen Gärlösung wird der Ertrag an Citronensäure wesentlich gesteigert.

5. Zusatz von Gelatine zur Gärlösung verursacht eine starke Beschleunigung der Säurebildung und ermöglicht gleichmäßiges Pilzwachstum. Der ebenfalls durch Gelatine hervorgerufene rasche Abbau der gebildeten Citronensäure läßt sich durch Zufügung einer größeren Menge Mineralsäure hemmen.

6. Auf der schließlich ermittelten „Standardlösung" liefert der Pilz einen reproduzierbaren Gärverlauf mit 40 bis 45 % Ausbeute an Citronensäure, bezogen auf angewendeten Zucker.

7. Da die gleiche Lösung die Züchtung des Pilzes unter Erhaltung seines Vermögens der Citronensäurebildung ermöglicht, können Züchtung und Gärung auf ein und demselben Substrat durchgeführt werden.

8. Durch Vergiftung der zu vergärenden Lösung mit Arsenverbindungen wurde die Gärung in einigen Fällen unbedeutend begünstigt.

9. Die Gegenwart von Chloroform im Gäransatz beeinflußt die Bildung der Citronensäure ungünstig.

10. Im gleichen Sinne wirkt Kaliumcyanid. Sein Einfluß äußert sich jedoch mehr in starker Verzögerung des Pilzwachstums und infolgedessen verspätetem Beginn der Gärung als in Verschlechterung der Ausbeute.

Literatur.

1) *C. Wehmer*, Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze, Nr. 1. Hannover 1893. — 2) *Derselbe*, Chem.-Ztg. **21**, 381, 1022, 1897. — 3) *B. Zahorski*, U. S.-P. 1066358. — 4) *J. N. Currie*, J. of biol. Chem. **31**, 15, 1917. — 5) *C. Wehmer*, Chem.-Ztg. **57**, 314, 1933. — 6) *K. Bernhauer*, Die oxydativen Gärungen. Berlin, Springer, 1932. — 7) D. R.-P. Nr. 578820. — 8) *H. Wüstenfeld*, Dissertation. Berlin 1908. — 9) *H. Amelung*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **166**, 161, 1927. — 10) *K. Bernhauer*, Biochem. Zeitschr. **172**, 304, 1926. — 11) *Wl. Butkewitsch*, ebenda **131**, 327, 1922. — 12) *A. Frey*, diese Zeitschr. **2**, 272, 1931. — 13) *H. Haehn*, D. R.-P. Nr. 544589, Kl. 12o.

(Aus dem Botanischen Institut der kgl. ungar. Hochschule für Berg- und Forstingenieure in Sopron.)

Experimentelle Untersuchungen über die mikrobiologischen Grundlagen der Schwankungen der Bodenazidität. II.

Von

D. Fehér.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. März 1934.)

Einleitung.

In meiner ersten Arbeit (1) habe ich gezeigt, daß namentlich die bedeutenderen Schwankungen der Bodenazidität in der freien Natur und in den Lagerproben auf die Tätigkeit der Bodenbakterien zurückgeführt werden können. Ich habe dabei die physiko-chemische Rolle des Wassergehalts außer acht gelassen, weil, wie ich im folgenden nachzuweisen gedenke, die bei meinen Beobachtungen und experimentellen Untersuchungen vorliegenden Feuchtigkeitsprozente bei der von mir gewählten Verdünnung von 1 : 2 eine derart untergeordnete Rolle spielen, daß man sie vernachlässigen konnte. Denn die Schwankungen der Bodenfeuchtigkeit überschritten bzw. erreichten fast nie die Grenzen, wo die Veränderung des Wassergehalts die Zersetzungsarbeit der Bodenmikroorganismen wesentlich beeinflussen könnte. Unsere schon vorher angestellten Voruntersuchungen haben dies einwandfrei gezeigt. Auch sind, wie ich in der erwähnten Arbeit bereits gezeigt habe, die sterilisierten bzw. entkeimten Bodenproben ohne Rücksicht auf ihren Wassergehalt vollkommen unverändert geblieben und haben nur geringe Änderungen infolge des veränderten Wassergehalts aufgewiesen. Diese Untersuchungen hatten auch bewiesen, daß bei gleichbleibendem Wassergehalt, Zugabe von verschiedenen Mengen biologisch aktiver Bodensubstanz in vorher sterilisierten Bodenproben, schon nach relativ kurzer Zeit bedeutende Änderungen in der Bodenazidität hervorrufen kann. Die folgenden Ausführungen sollen nunmehr theoretische und experimentelle Untersuchungen vorlegen, welche wir zur weiteren Klärung des biologischen Charakters dieses Problems schon vor einigen Jahren in Angriff nahmen und teilweise auch jetzt noch fortsetzen.

1. Der theoretische Nachweis der Einwirkung des Wassergehalts.

Die Beschaffenheit der Suspension, in der die Bodenproben auf ihre p_H-Zahl untersucht werden sollen, bildet seit längerer Zeit den

Gegenstand lebhafter Erörterung (2). Wir haben in meinem Institut nach einer Reihe von Voruntersuchungen das feste Verhältnis zwischen Bodenprobe und dest. Wasser 1 : 2 gewählt, wobei uns der Grundgedanke leitete, zwischen Boden und Wasser ein Verhältnis zu wählen, bei welchem der Feuchtigkeitszustand des Bodens in physiko-chemischer Hinsicht fast gänzlich wirkungslos bleibt. Ich werde im folgenden zunächst mathematisch nachweisen, daß unser Vorgehen richtig war, betone aber im voraus, daß bei den p_H-Messungen das Verhältnis zwischen Boden und Wasser ziemlich belanglos wird, wenn man jedesmal den Wassergehalt der Böden ermittelt.

Ermittelt man nämlich den Wassergehalt des Bodes vor der p_H-Messung, so kann man jede p_H-Änderung, die infolge der Schwankung des Wassergehalts hervorgerufen wird, berechnen oder mit Hilfe von Kurven ermitteln. Namentlich bei Massenuntersuchungen ist natürlich die Anwendung eines festen Verhältnisses immer zweckmäßiger und in diesem Falle auch fehlerfreier als die zeitraubende Berechnung und Herstellung des konstanten Wassergehalts. Ich halte es also für besser, die Bodenproben möglichst sofort nach der Entnahme auf ihre p_H-Zahl zu untersuchen und den Wassergehalt zu bestimmen. Man gelangt so zu den beiden regulierenden Faktoren, welche es erlauben, die p_H-Werte einwandfrei zu vergleichen. Es liegt nämlich in der Natur der p_H-Bestimmung, daß von der H-Ionenkonzentration einer gegebenen Verdünnung aus die H-Ionenkonzentration einer anderen Verdünnung desselben Bodens jederzeit theoretisch ermittelt werden kann.

Bei Bodenuntersuchungen muß man natürlich stets beachten, daß hier keine homogene Mischung von chemischen Verbindungen besteht. Jede Bodenprobe ist ein buntes Gemenge von verschiedenen chemischen Verbindungen, welche sich auch gegenseitig beeinflussen können, so daß die Berechnungen und Messungen von Bodensuspensionen auch des gleichen Bodens immer gewisse Unterschiede aufweisen, die in seiner komplizierten chemischen Natur und Konstitution bedingt sind. Berücksichtigt man außerdem auch die individuellen Beobachtungsfehler, so kann man feststellen, daß die Azidität eines Bodes nicht mit der gleichen Exaktheit, wie die Azidität einer reinen Lösung bestimmt werden kann. Da man aber den Grad der Bodenazidität zumeist für biologische Zwecke bestimmt, wo Unterschiede des p_H von geringerer Größenordnung als 0,1 fast vollkommen wirkungslos sind, so kann man, falls Übereinstimmung zwischen Berechnung und Versuch innerhalb dieser Größenordnung besteht, wenigstens in biologischer Hinsicht noch von einer guten Übereinstimmung sprechen.

Unser Gedankengang war der folgende:

Wenn wir die Bodensuspensionen in einem bekannten und festen Verhältnis zwischen Boden und dest. Wasser vorbereiten und die Menge des zugegebenen dest. Wassers mit a_1 und die Wassermenge des natürlichen Feuchtigkeitsgehalts des Bodens mit a_2 bezeichnen, so können wir bei jeder Probe die tatsächlich vorhandene Wassermenge a berechnen. Es ist nämlich

$$a = a_1 + a_2.$$

Wenn wir jetzt die tatsächlich gefundene Wasserstoffzahl mit p bezeichnen, sowie die gesamte Wassermenge bei einer zweiten Verdünnung mit b, also

$$b = b_1 + b_2,$$

und die vorläufig unbekannte p_H-Zahl dieser Lösung mit x, so ist

$$a \frac{10^{-p}}{1000} \cdot \eta = b \frac{10^{-x}}{1000}, \qquad \text{wenn } p_H < 7.$$

Der Faktor η wird so berechnet, daß man das veränderte Bodengewicht durch das ursprüngliche Bodengewicht dividiert. Bezeichnen wir das erste mit q_1 und das zweite mit q_2, so ist

$$\eta = \frac{q_1}{q_2}.$$

Die Anbringung des Faktors η ist natürlich nur annähernd richtig, da dieses Vorgehen eine Homogenität des Bodens voraussetzt, welche gewöhnlich nicht vorhanden ist. Die spateren Berechnungen und Versuche werden aber zeigen, daß dieser Faktor bis zu einer gewissen Grenze gut verwendet werden kann. Die Entwicklung der angegebenen Formel erfolgt nun folgendermaßen:

$$10^x = \frac{b}{\eta \cdot a} \cdot 10^p;$$

daraus folgt

$$\underline{x = p + \log b - \log \eta \,.\, a}, \text{ wenn } p_H < 7.$$

Wenn $p_H > 7$, so muß man natürlich auch die OH-Ionen berücksichtigen. Man schreibt also

$$10^{-y} = \frac{10^{-14,14}}{10^{-p}} = \frac{10^p}{10^{14,14}},$$

wobei y den Exponent der OH-Ionen für die Lösung mit der Wasserstoffzahl p bedeutet. Aus dieser Gleichung folgt

$$y = 14,14 - p.$$

Wenn man jetzt den vorerst noch unbekannten OH-Ionen-Exponenten der veränderten Bodensuspension mit z bezeichnet, so ist

$$z = 14,14 - p + \log b - \log \eta \,.\, a.$$

Wenn man nun annimmt, daß

$$10^{-x} = \frac{10^{-14 \cdot 14}}{10^{-z}},$$

so ist

$$x = 14,14 - z$$

und schließlich

$$\underline{x = p + \log \eta \,.\, a - \log b}, \quad \text{wenn } p_H > 7.$$

Um die Richtigkeit dieser Gleichungen nachzuprüfen, haben wir eine Reihe von Versuchen eingeschaltet, die hier kurz beschrieben werden.

Die Ausführung erfolgte mit der bekannten Chinhydronelektrode und mit einer Apparatur, die in der Literatur (3) schon öfters beschrieben

wurde. Wir haben auf die Vorbereitung der Bodenproben besondere Sorgfalt verwendet, um moglichst alle Fehlerquellen, die infolge unzureichender und ungenügender mechanischer Vorbereitung entstehen konnten, auszuschalten, und alle Bodenproben vorher sorgfältig getrocknet, gründlich durchgemischt und durchgesiebt. Vor der Messung wurden sie 30 Minuten lang durchgeschüttelt, und das dest. Wasser wurde genau auf $p_H = 7$ eingestellt. Bezüglich der verschiedenen mechanischen Behandlungsmethoden der p_H-Proben haben wir eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, wobei eine Schutteldauer von ungefahr 30 Minuten die besten Erfolge ergab.

Tabelle I.

Wassergehalt %	p_H-Werte gemessen	p_H-Werte berechnet	Δ	p_H-Werte gemessen	p_H-Werte berechnet	Δ
0	8,062	8,062		5,830	5,830	
5	8,022	8,029	+ 0,007	5,842	5,852	+ 0,010
10	7,981	7,996	+ 0,015	5,855	5,876	+ 0,021
15	7,949	7,960	+ 0,011	5,869	5,894	+ 0,025
20	7,910	7,924	+ 0,014	5,886	5,912	+ 0,026
25	7,875	7,886	+ 0,011	5,904	5,935	+ 0,031
30	7,838	7,846	+ 0,008	5,924	5,954	+ 0,030
35	7,795	7,805	+ 0,010	5,947	5,980	+ 0 033
40	7,750	7,761	+ 0,011	5 972	6,002	+ 0,039
45	7,701	7,724	+ 0,023	6,001	6,040	+ 0,039
50	7,649	7,664	+ 0,015	6,034	6,080	+ 0,046
55	7,590	7,610	+ 0,020	6,071	6,121	+ 0,050
60	7,521	7,550	+ 0,029	6,114	6,175	+ 0,061
65	7,460	7.484	+ 0,024	6,164	6,222	+ 0,058
70	7.382	7.409	+ 0,027	6,223	6,280	+ 0,057
75	7,300	7,322	+ 0,022	6,273	6,342	+ 0,069
80	7,190	7,217	+ 0,027	6,382	6,430	+ 0,048
85	7,099	7,075	— 0,021	6,500	6,530	+ 0,030
90	7,023	7,000	— 0,023	6,669	6,670	+ 0,001
95	6,992	7,000	+ 0.008	6,962	6 820	— 0,142
97		7,000			7,000	
99.9		7,000			7,000	

Die Zahlen der Tabelle I zeigen, daß die Ergebnisse der theoretischen Berechnung und der praktischen Messung innerhalb der bereits erwahnten Fehlergrenze meistens ganz gut ubereinstimmen. Die Unterschiede sind wahrscheinlich großtenteils auf die Unhomogenität und auf die chemisch-physikalische Konstitution des Bodens zuruckzufuhren. Auf Grund dieser theoretischen Erwägungen und der mitgeteilten Messungen konnten wir feststellen, daß bei Bestimmung des Wassergehalts einer Bodenprobe die p_H-Zahl dieses Bodens bei einem anderen Feuchtigkeitsgrad durch eine einfache Berechnung jederzeit ermittelt werden kann. Ob man jetzt bei der Messung ein festes Verhaltnis zwischen Boden und Wasser anwendet oder aber alle Bodenproben auf denselben Wassergehalt bringt, spielt keine besondere Rolle. Das Hauptgewicht des Problems liegt — wie ich schon erwähnt habe — in der genauen Bestimmung des Wassergehalts.

Im folgenden werde ich nun auch zeigen daß bei den meisten Waldböden, wo die Feuchtigkeitsprozente zwischen 10 und 25 % schwanken, die durch die Veränderung des Wassergehalts hervorgerufenen Aziditätsveränderungen derart gering sind, daß sie, wenigstens in biologischer Hinsicht, überhaupt nicht in Betracht kommen. An der Hand der Tabelle I kann man nämlich die biologischen Änderungen von den physiko-chemischen Änderungen, die von dem Wassergehalt hervorgerufen werden, jederzeit in einfacher Weise trennen. Ich habe diese Trennung beispielsweise an der Hand bereits a. a. O. (4) mitgeteilter Untersuchungen durchgeführt und das Ergebnis in Tabelle II zusammengefaßt.

Die Zahlen zeigen, daß diese oft beträchtlichen Veränderungen, welche in den Waldböden periodisch (jahreszeitlich) vorkommen, überwiegend von biologischer Natur sind. Das gleiche gilt für weitere experimentelle Untersuchungen (1). Ich bringe in Tabelle III einige charakteristische Beispiele.

Da die p_H-Untersuchungen meines Instituts seit Jahren auf Grund des Verhältnisses zwischen Boden und dest. Wasser 1 : 2 durchgeführt wurden, so sind sie natürlich alle miteinander vergleichbar. Steigt der Feuchtigkeitsgehalt eines Bodens über 25 bis 30 % hinaus, so wird der physiko-chemische Einfluß des Wassergehalts stärker. Wasserstoffionen-Zahlen von Böden mit derartigen Schwankungen im Feuchtigkeitsgehalt sind natürlich nicht vergleichbar. Hat man aber auch hier den Feuchtigkeitsgehalt immer gewissenhaft bestimmt, so kann man mit Hilfe des oben beschriebenen rechnerischen Verfahrens alle p_H-Zahlen auf eine Vergleichsbasis umrechnen.

2. *Der Nachweis des biologischen Ursprungs der p_H-Änderungen des Bodens.*

Um nun den vornehmlich biologischen Ursprung der p_H-Änderungen, die sich im Boden abspielen, unzweideutig nachzuweisen, habe ich in meiner ersten Arbeit den einzig gangbaren Weg der Sterilisation des Bodens eingeschlagen. Zur weiteren Bestätigung habe ich bei den im folgenden beschriebenen neueren Versuchen zunächst verschiedene Methoden zur Inaktivierung der Böden erprobt und die p_H-Änderungen auch bei gleichem Wassergehalt nachgewiesen. Später wurden die Bodenproben auch mikrobiologisch untersucht. Die Bestimmung des Bakteriengehaltes erfolgte nach der gewöhnlichen Plattenmethode (3).

Es wurde in der letzten Zeit von verschiedenen Autoren vorgeschlagen (2), die Bodenproben stets bei einem Wassergehalt von 80 % zu untersuchen. Ich konnte schon früher zeigen, daß der Wassergehalt der Bodenproben, die bei dem festen Verhältnis 1 : 2 untersucht werden und deren Feuchtigkeitsprozente nur zwischen 5 und 25 schwanken, während der Untersuchung ungefähr auf 60 bis 80 % reguliert wird. Um jedoch ganz exakt zu arbeiten, habe ich meine

Tabelle II.

Nr.	Zeitpunkt der Messung	Wassergehalt %	p_H-Werte gemessen 1 · 2	Berechnete p_H-Werte bezogen auf den ursprunglichen Wassergehalt (20,4%)	Unterschiede zwischen den berechneten und den gemessenen p_H-Werten 1	es entfallen davon auf die Wirkung der Bodenfeuchtigkeit 2	es entfallen davon auf die biologische p_H-Schwankung 3	2 %	% 3	Gesamt-Wassergehalt bei der Messung 1 : 2
	1929									
1	1.—15. XI.	20,4	5,36	5,360						73,5
2	15.—30.	20,7	5,35	5,361	— 0,01	— 0,001	— 0,011	10	110	73,6
3	1.—15. XII.	21,4	4,56	5,368	— 0,80	— 0,008	— 0,808	1	101	73,8
4	15.—31.	21,2	5,09	5,365	— 0,27	— 0,005	— 0,275	2	102	73,7
	1930									
5	1.—15. I.	21,4	4,89	5,368	— 0,47	— 0,008	— 0,478	2	102	73,9
6	15.—31.	20,3	4,87	5,360	— 0,49		— 0,490		100	73,4
7	15.—28. II.	21,1	5,17	5,368	— 0,19	— 0,008	— 0,198	82	104	73,7
8	1.—15. III.	23,4	5,19	5,383	— 0,17	— 0,023	— 0,193	7	107	74,5
9	15.—31.	24,2	4,96	5,388	— 0,40	— 0,028	— 0,428	7	107	74,8
10	1.—15. IV.	18,4	4,94	5,346	— 0,42	+ 0,014	— 0,406	3	97	72,9
11	15.—30.	21,9	4,66	5 372	— 0,70	— 0,012	— 0,712	2	107	74,0
12	1.—15. V.	18,4	5,05	5,346	— 0,31	+ 0,014	— 0,396	4	96	72,9
13	15.—31.	16.7	4,99	5,335	— 0,37	+ 0,025	— 0,345	7	93	72,3
14	1.–15. VI.	13,9	4,92	5,314	— 0,44	+ 0,046	— 0.394	6	94	71,4
15	15.—30.	10,0	5,08	5,286	— 0,28	+ 0,074	— 0,206	26	74	70,0
16	1.—15. VII.	8,6	5,02	5,277	— 0,34	+ 0,083	— 0,257	24	76	69,6
17	15.—31.	11,2	4.92	5,296	— 0,44	+ 0,064	— 0,376	14	86	70,5
18	1.—15. VIII.	11,4	4,86	5,288	— 0,50	+ 0,072	— 0,428	14	86	70,6
19	15.—31.	12,2	5,07	5,301	— 0,29	+ 0,059	— 0,231	20	80	70,8
20	1.—15. IX.	11,7	5,11	5,298	— 0,25	+ 0,062	— 0,188	24	76	70,7
21	15.—30.	14,6	5,02	5,319	— 0,34	+ 0,041	— 0,299	12	88	71,6
22	1.—15. X.	10,5	5,25	5,291	— 0,11	+ 0,069	— 0.041	63	37	70,3
23	15.—31.	14,0	6,05	5,314	+ 0,69	+ 0,046	+ 0,736	7	107	71,4
24	1.—15. XI.	14.9	6,04	5,321	+ 0,68	+ 0,039	+ 0,719	6	106	71,7
25	15.—30.	17,0	5,22	5,335	— 0,14	+ 0,025	— 0,115	18	82	72,4

Tabelle III.

Nr	Zeitpunkt der Messung	Wassergehalt	p_H-Werte gemessen	Berechnete p_H-Werte bezogen auf den ursprünglichen Wassergehalt (20,8%)	Unterschiede zwischen den berechneten und den gemessenen p_H-Werten	es entfallen davon auf die Wirkung der Bodenfeuchtigkeit	es entfallen davon auf die biologische p_H-Schwankung	%	%	Gesamt-Wassergehalt bei der Messung
	1931	%	1 2		1	2	3	2	3	1 2
1	12. III.	20,8	6,82							73,6
2	16. III.	20,2	6,79	6,815	+ 0,03	+ 0,005	+ 0,035	17	117	73,4
3	19. III.	20,2	7,04	6,815	— 0,22	+ 0,005	— 0,215	2	98	73,4
4	23. III.	20,0	5,75	6,813	+ 1,07	+ 0,007	+ 1,114	1	101	73,3
5	27. III.	20,7	7,11	6,819	— 0,29	+ 0,001	— 0,239		100	73,6
6	31. III.	19,9	7,20	6,813	— 0,38	+ 0,007	— 0,373	2	98	73,3
7	5. IV.	19,6	6,49	6,813	+ 0,33	+ 0,007	+ 0,337	2	102	73,2
8	10. IV.	19,3	6,46	6,812	+ 0,36	+ 0,008	+ 0,368	2	102	73,1
9	16. IV.	18,9	6,06	6,811	+ 0,76	+ 0,009	+ 0,769	1	101	73,0
10	23. IV.	17,7	6,01	6,808	+ 0,81	+ 0,012	+ 0,822	2	102	72,7
11	28. IV.	17,0	6,07	6,806	+ 0,75	+ 0,014	+ 0,764	2	102	72,4
1	12. III.	20,8	6,82							73,6
2	16. III.	16,8	6,62	6,806	+ 0,20	+ 0,014	+ 0,214	7	107	72,3
3	19. III.	14,7	7,21	6,800	— 0,39	+ 0,020	— 0,370	5	95	71,6
4	23. III.	12,9	5,12	6,796	— 1,70	+ 0,024	+ 1,676	2	98	71,1
5	27. III.	11,3	7,08	6,792	— 0,26	+ 0,028	— 0,232	11	89	70,5
6	31. III.	10,2	7,20	6,789	— 0,38	+ 0,031	— 0,349	5	95	70,2
7	5. IV.	6,4	6,63	6,779	+ 0,19	+ 0,041	+ 0,231	22	122	68,9
8	10. IV.	4,6	6,66	6,774	+ 0,16	+ 0,046	+ 0,206	29	129	69,0
9	16. IV.	4,7	6,19	6,774	+ 0,63	+ 0,046	+ 0,676	7	107	69,0
10	23. IV.	3,5	6,11	6,772	+ 0,71	+ 0,048	+ 0,758	7	107	67,9
11	28. IV.	2,3	6,20	6,769	+ 0,62	+ 0,051	+ 0,671	21	121	67,5

Bodenproben stets auf 80 % Wassergehalt gebracht, genau wie in der letzten Zeit vorgeschlagen wurde (2).

Versuch 1 wurde mit drei verschiedenen Böden durchgeführt. Die Versuchsdauer ist in der Abb. 1 angegeben. Probe *L* entstammt einem Waldboden mit Fichten mittleren Alters, Probe *N* dem Boden eines Eichenwaldes von mittlerem Alter (*Quercus sessiliflora*), Bodenprobe *K* dem Boden eines ziemlich sauren Fichtenwaldes von mittlerem Alter. Die ausgestreute Probe wurde innerhalb 1 Stunde nach der Probeentnahme sofort bei Zimmertemperatur entsprechend behandelt. Die mit 105° C bezeichnete Probe wurde 24 Stunden lang in einer elektrischen Trockenkammer auf 105° C gehalten, die „sterile" Probe bei 1,5 Atm. Druck in heißem Dampf dreimal hintereinander mit 24 Stunden Abstand sterilisiert.

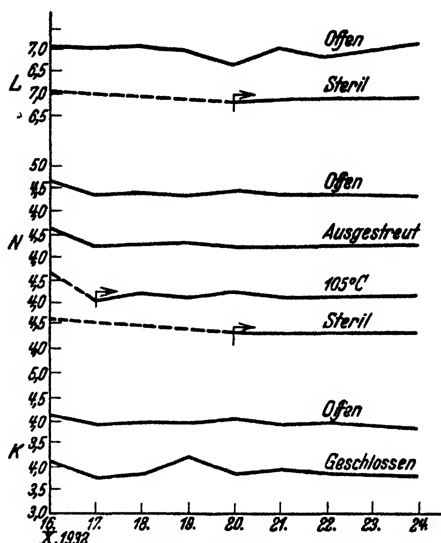


Abb. 1.

Δ = Unterschied zwischen den maximalen und minimalen p_H-Werten (nach der Reihenfolge von oben nach unten) 0,56, 0,07, 0,30, 0,42, 0,17, 0,01, 0,21, 0,30.

Die Untersuchungsergebnisse zeigt Abb. 1. Die Untersuchung der p_H-Proben erfolgte ausschließlich bei 80 % Feuchtigkeitsgehalt. Das Ergebnis ist eindeutig. Die sterile Probe ist vollkommen inaktiv geblieben, ferner konnte weder Trocknen bei Zimmertemperatur noch 24stündiges Trocknen bei 105° C die Inaktivierung der Mikrobenwelt herbeiführen. Ich habe in meiner letzten Arbeit (5) ja schon gezeigt, daß eine beträchtliche Anzahl von Bodenbakterien diese Hitzegrade überdauert.

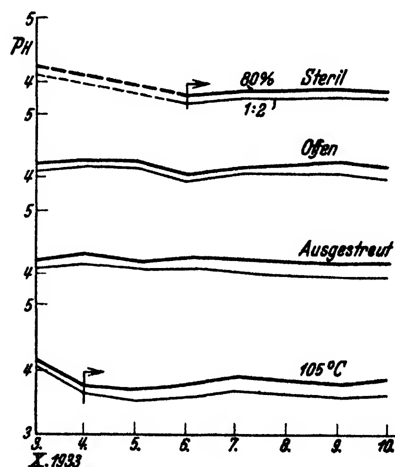


Abb. 2.

Δ = Unterschied zwischen den maximalen und minimalen p_H-Werten (nach der Reihenfolge von oben nach unten) 0,09, 0,10, 0,19, 0,21, 0,15, 0,14, 0,14, 0,12.

Versuch 2. In diesem Versuch mit Boden der Versuchsfläche *K* haben wir die p_H-Untersuchungen gleichzeitig bei 80 %igem Wassergehalt und bei dem festen Verhältnis von

1 : 2 durchgeführt. Die zwei in Abb. 2 dargestellten Ergebnisse bestätigen diejenigen des ersten Versuchs. Es soll noch besonders betont werden, daß die relativen p_H-Änderungen der bei 80 % Wassergehalt untersuchten Bodenproben und der Proben, bei denen das Verhältnis 1 : 2 eingehalten worden war, vollkommen parallel verlaufen. (Siehe Abb. 2.)

Versuch 3. Hierzu wurde der Boden eines Eichenwaldes von mittlerem Alter verwendet. Ein Teil der Proben wurde ausgestreut, ein anderer 24 Stunden lang bei 105° C getrocknet und ein dritter nach dem Vorschlag von *Pistor* (6) 24 Stunden lang in einem der üblichen Vakuumtrockenapparate bei 30 bis 35° C getrocknet, indem die zugeführte Luft mit Schwefelsäure getrocknet und der Luftdruck mit Hilfe einer *Leybold*schen Vakuumpumpe auf 18 bis 20 mm Quecksilber gehalten wurde. Ein Teil der Proben wurde ferner 12 Stunden lang im Vakuum und dann 24 Stunden lang bei 105° C unter normalem Druck im Trocknungsapparat getrocknet. Einige Proben wurden normal sterilisiert und nachher mit aktiver Erde geimpft.

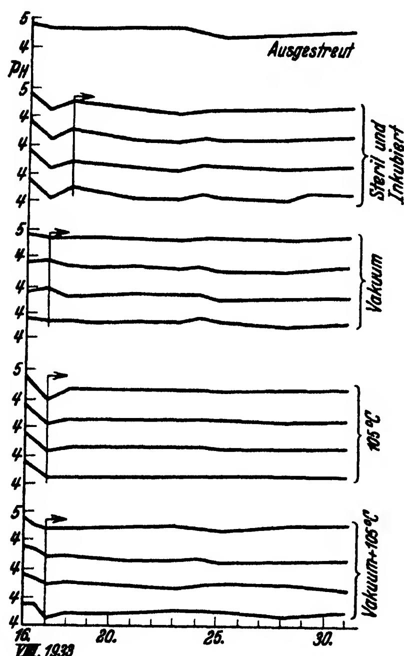


Abb. 3.
Δ = Unterschied zwischen den maximalen und minimalen p_H-Werten (nach der Reihenfolge von oben nach unten) 0,72, 0,23, 0,12, 0,25, 0,36, 0,18, 0,33, 0,34, 0,22, 0,34, 0,26, 0,15, 0,09, 0,20, 0,20, 0,24, 0,32.

Die Proben dieses in Abb. 3 dargestellten Versuchs haben schon anfangs ziemlich beträchtliche Änderungen erlitten; sie wurden alle ohne Ausnahme saurer. Die Trocknung bei 105° C wirkte besonders kräftig. Ich habe schon in meiner früheren Arbeit (1) darauf hingewiesen, daß durch die Einwirkung dieser hohen Temperatur wahrscheinlich in der inneren Struktur der Bodenkolloide starke Verschiebungen und größtenteils irreversible kolloidchemische Reaktionen mit Beeinflussung des p_H-Wertes hervorgerufen werden, die allein durch die physikalische Wirkung des Wasserverlustes nicht erklärt werden können, zumal die Bodenproben bei allen diesen Versuchen vor und nach der Behandlung auf den gleichen Wassergehalt gebracht wurden. Bei diesem Versuch haben wir auch die Veränderungen während der Trocknung verfolgt; Abb. 3 zeigt uns, daß nur ein Teil der Veränderungen durch nachträglichen Wasserzusatz wettgemacht werden

konnte. Der Unterschied wird also sicherlich durch die Wärme hervorgerufen. Auch die Sterilisation mit heißem Dampf verursacht infolge dieser Wärmewirkung eine starke Veränderung der p_H-Werte, so daß, ähnlich wie bei dem Trocknungsprozeß, der p_H-Wert zunimmt. Die Übereinstimmung aller dieser Ergebnisse beweist, daß die Erniedrigung der p_H-Werte teilweise auch der physikalischen Wirkung der Hitze zuzuschreiben ist.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen weiter, daß weder die Trocknung im Vakuum, noch die Trocknung bei 105° C imstande sind, die mikrobiologische Aktivität und die damit verbundenen p_H - Schwankungen eines Bodens stillzulegen. Die Veränderungen der ausgestreuten Probe sind ebenfalls merklich. Die größten Veränderungen finden wir bei den im Vakuum behandelten und bei den nach der Sterilisation geimpften Proben. Die Veränderungen der p_H - Werte nach dem Trocknen bei 105° C sind verhältnismäßig am geringsten. Ich möchte noch betonen, daß hier alle Messungen bei einem Wassergehalt von 80 % durchgeführt wurden.

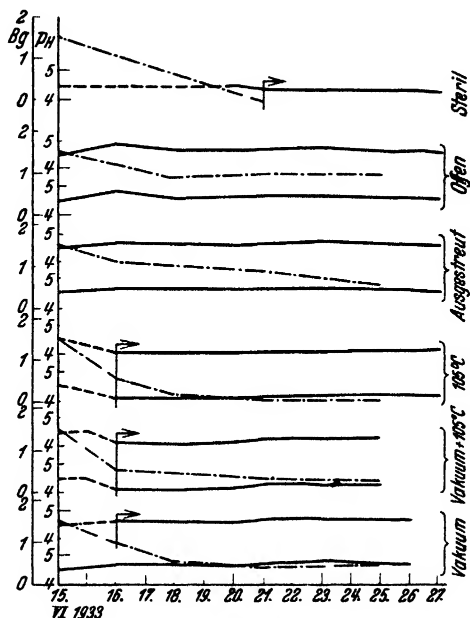


Abb. 4.

Δ = Unterschied zwischen den maximalen und minimalen p_H-Werten (nach der Reihenfolge von oben nach unten) 0,05, 0,34, 0,30, 0,23, 0,27, 0,17, 0,18, 0,20, 0,18, 0,17, 0,13.

Versuch 4 wurde mit dem Boden der Versuchsfläche *L* durchgeführt, mit dem Unterschied jedoch, daß die sterile Probe während der Versuchsdauer sorgfältig vor Infektion geschützt wurde. Die Kontrolle wurde in einem offenen Gefäß gehalten. Die sterilen Proben wurden, um möglich vollkommene Sterilität zu erreichen, in Reagensgläser verteilt, sterilisiert und aufbewahrt, was die Schwankungen des Wassergehalts dieser Proben erklärt.

Die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse dieses Versuches, bei dem wir auch eine bakteriologische Untersuchung durchführten, bestätigen diejenigen des Versuchs 3. Sie beweisen deutlich den Zusammenhang zwischen der biologischen Aktivität des Bodens und den p_H-Veränderungen. Wenn man von der Sterilisation absieht, so ist natürlich am wirksamsten die Trocknung bei 105° C während 24 Stunden. Die

Trocknung im Vakuum ist wenigstens in mikrobiologischer Hinsicht ziemlich wirkungslos. Am stärksten war natürlich die Wirkung der Sterilisation; die sterilen Proben sind auch nach der Impfung im Verhältnis zu den übrigen Böden verhältnismäßig recht inaktiv geblieben.

Das Ergebnis des Versuches ist in mikrobiologischer Hinsicht insofern besonders interessant, als sich gezeigt hat, daß die Bodenbakterien auch bei recht niedrigem Feuchtigkeitsgehalt des Bodens ihr Leben weiterführen können. Nach Angaben in der Literatur der letzten Jahre wird das Bakterienleben des Bodens bei einem Feuchtigkeitsgehalt von 10 bis 5 % fast vollkommen gehemmt. Diese Behauptung, die man meist durch mikrobiologische Beobachtungen zu stützen suchte, ist nach den Ergebnissen dieses Experiments nicht haltbar.

Ich möchte noch darauf hinweisen, daß der Versuch, auf Grund rein chemischer und physiko-chemischer Befunde ohne gründliche mikrobiologische Untersuchung den biologischen Zustand eines Bodens zu charakterisieren leicht, wie auch in diesem Falle, zu Fehlschlüssen führt. Daß die Bodenbakterien auch bei niedrigem Feuchtigkeitsgehalt des Bodens ihr Leben fortführen konnen, habe ich in einer anderen Arbeit (5) besonders betont. Daß sie noch bei recht niedrigem Wassergehalt des Bodens leben konnen, beweist deutlich der Umstand, daß sich ihre Anzahl während der Versuchsdauer im positiven oder negativen Sinne ununterbrochen ändert. Es hat ja auch die Untersuchung der ganz trockenen Steppen- und Wüstenboden, die in meinem Institut auch jetzt noch untersucht werden, den klaren Beweis erbracht, daß eine große Anzahl Bodenbakterien noch in ganz trockenen Boden leben kann (7).

Außer diesem Versuch haben wir noch weitere zur Bestätigung der mitgeteilten Ergebnisse durchgeführt. Da sie aber das eben Gesagte bestätigen, so kann hier von der Mitteilung abgesehen werden.

Die Ergebnisse dieses Versuches beweisen jedenfalls den kausalen Zusammenhang zwischen den Änderungen der p_H-Werte und der biologischen Aktivität des Bodens. Nur die sterile Probe, in der alle Keime vernichtet wurden, blieb unverändert. Die offene Probe, deren Wassergehalt sich weniger verändert hat, zeigte ganz beträchtliche Schwankungen. Die Veränderungen der p_H-Werte der ausgestreuten Probe sind geringer. Wenn man nunmehr die Ergebnisse der p_H-Messungen mit denen der bakteriologischen Untersuchung vergleicht, so wird man unwillkürlich zu der Einsicht kommen müssen, daß zwischen der Tätigkeit der Bodenbakterien und der Veränderungen der p_H-Werte ein unverkennbarer Zusammenhang besteht.

Versuch 5 wurde im März 1933 mit dem Boden der Versuchsflächen *L* und *K* durchgeführt. Die Proben standen in offenen Glasgefäßen. Der Zweck des Versuches war, den Zusammenhang zwischen den Änderungen der Bakterienzahl und den Änderungen der p_H-Werte eingehend nachzuweisen. Nach den in Abb. 5 mitgeteilten Daten verlaufen die Änderungen des Bakteriengehalts im großen und ganzen

parallel mit den Änderungen der p_H-Werte, wodurch auch experimentell die Zusammenhänge bestätigt werden, die ich in meinen früheren Arbeiten ermittelt habe (3). Da die Proben in offenen Glasgefäßen gehalten wurden, so haben natürlich schließlich die aeroben Bakterien die Oberhand gewonnen, eine recht intensive Zersetzungsarbeit entfaltet und die anfangs sauren Halbprodukte der Verwesung vollständig verarbeitet. Die Änderungen der Bodenazidität sind bei diesem Versuch auffallend hoch. Wir haben nämlich hier mit Frühjahrsproben zu tun gehabt, die infolge ihrer unverbrauchten Humusreserve eine viel intensivere Bakterientätigkeit erlaubten als jene Proben, die im Laufe des Sommers und Herbstes vor dem Laubfall gesammelt wurden.

Versuch 6. Ich bringe noch zum Schluß in Abb. 6 die Ergebnisse unserer mehrjährigen Untersuchungen, deren Ergebnisse wenigstens teilweise auch in dem ersten Teil dieser Untersuchungen (1) mitgeteilt werden. Von den angesetzten acht Proben wurden die Proben 1 bis 4 sterilisiert, die übrigen im ursprünglichen Zustand belassen. Die Behandlung der Bodenproben zeigt uns die Legende unter der Abb. 6. Die sterilisierten Proben wurden mikrobiologisch nochmals untersucht, wobei sich ergab, daß nur die Probe 1 steril geblieben war, während

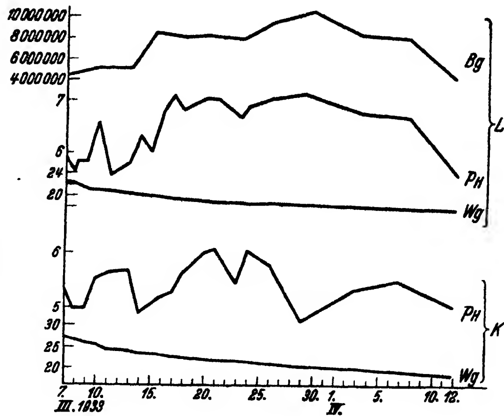


Abb. 5.
Δ = der Unterschied zwischen den maximalen und minimalen p_H-Werten (nach der Reihenfolge von oben nach unten) 1,58, 1,38.

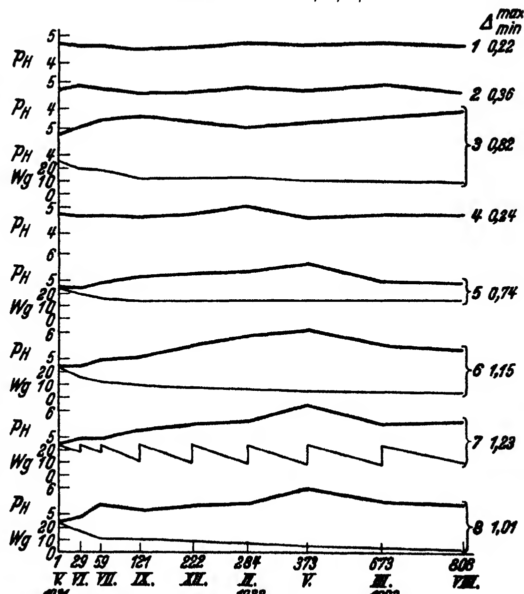


Abb. 6.
1. Steril, geschlossen; $\Delta = 0{,}22$. 2. Steril, mit Watte abgeschlossen; $\Delta = 0{,}36$. 3. Steril, inkubiert; $\Delta = 0{,}82$. 4. Steril mit Watte abgeschlossen; $\Delta = 0{,}24$. 5. Geschlossen; $\Delta = 0{,}74$. 6. Offen; $\Delta = 1{,}15$. 7. Mit Watte abgeschlossen, inkubiert; $\Delta = 1{,}23$. 8. Mit Watte abgeschlossen; $\Delta = 1{,}01$. Δ = der Unterschied zwischen den maximalen und den minimalen p_H-Werten.

die übrigen inzwischen mehr oder weniger infiziert worden sind. Probe 1 ist auch im Säuregrad fast völlig unverändert geblieben, während die übrigen ziemlich bedeutende Veränderungen zeigen. Die Ursache der Infektion dürfte in der unvorsichtigen Entnahme der Untersuchungsproben zu suchen sein.

Dieser Versuch beweist, daß mit der Zunahme der Bakterienzahl auch eine Zunahme der Veränderungen der p_H-Werte erfolgt. Bei den seinerzeit nicht sterilisierten Proben kann man eine ziemlich beträchtliche Erhöhung der p_H-Werte feststellen. Nur die geschlossene Probe, wo anscheinend die anaeroben Vorgänge überwiegen, zeigt eine gewisse Abnahme. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen ebenfalls die hohe Anpassungsfähigkeit der Bodenbakterien an die Trockenheit des Bodens. Daß selbst die bewässerte Probe eine sehr niedrige Bakterienzahl zeigt, hängt mit der starken Abnahme des Humusgehaltes zusammen.

3. Versuche zum Nachweis des Zusammenhanges zwischen den Veränderungen der p_H-Werte, der Leitfähigkeit und den mikrobiologischen Veränderungen im Boden.

Alle bisher durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß die meisten biochemischen Veränderungen der Böden, insbesondere die Aziditätsschwankungen, vornehmlich auf die Tätigkeit der Bodenmikroben zurückgeführt werden müssen. Um den endgültigen Beweis nun auch in einer anderen Richtung einwandfrei erbringen zu können, habe ich auch die Veränderungen der Leitfähigkeit des Bodens vom Standpunkte des Biologen aus untersucht. Übrigens hat schon *Pantanelli* (8) die Leitfähigkeit und die damit zusammenhängende Salzkonzentration der Böden zur Charakterisierung ihrer mikrobiologischen Tätigkeit herangezogen.

In einer früheren Arbeit, wo ich auf Grund ausgedehnter Versuche die Veränderungen der p_H-Werte der verschiedenen Wald- und auch einiger landwirtschaftlich benutzter Böden nachgewiesen habe (4), habe ich mich schon mit den Veränderungen der Leitfähigkeit befaßt und konnte den periodischen Charakter der ziemlich bedeutenden jahreszeitlichen Schwankungen der Gesamtsalzkonzentration der Böden nachweisen. Ohne auf die Einzelheiten dieser Untersuchungen einzugehen, möchte ich hier nur ganz kurz erwähnen, daß zwischen den Schwankungen der p_H-Werte und den Veränderungen der Leitfähigkeit ganz bestimmte Zusammenhänge festgestellt werden konnten. Dort, wo eine starke Konzentration der H-Ionen vorhanden war, also im Frühjahr und hauptsächlich im Winter, trat eine starke Erhöhung der Leitfähigkeit auf. Ich habe darauf hingewiesen, daß wahrscheinlich die freiwerdenden H-Ionen bzw. das *relative und quantitative* Verhältnis derselben auch die Leitfähigkeit der Böden beeinflussen können. Da jedoch diese Schwankungen, die oft ein ganz beträchtliches Ausmaß erreichen, durch die Aziditätserscheinung allein nicht erklärt werden konnten, so mußten wir schon damals voraussetzen, daß die Leitfähigkeit und die damit zusammenhängende Salzkonzentration der Böden auch durch die mikrobiologischen Verhältnisse bzw. durch die Intensität der Arbeit der Bodenmikroben stark beeinflußt werden. Die Änderungen

der p_H-Werte ergeben jedoch ein viel deutlicheres Bild von den biologischen und biochemischen Änderungen, welche sich im Waldboden abspielen, als die Ausschläge der Leitfähigkeit.

Die Versuchsanordnung war folgende: Außer den p_H-Werten und dem Wassergehalt bestimmten wir auch den Gehalt an Bakterien und Pilzen quantitativ in den einzelnen Proben. Es wurden stets Parallelversuche angesetzt, so daß die mitgeteilten Zahlen Mittelwerte sind. Versuchsobjekt war wieder der Boden der Versuchsfläche *L*, also ein Fichtenwaldboden. Einen Teil des Bodens haben wir im heißen Dampf unter Druck dreimal hintereinander mit 24stündigem Zeitintervall sterilisiert, einen anderen 24 Stunden lang bei 105° C getrocknet, wieder einen anderen Teil in großen flachen Glasgefäßen dünn ausgestreut. Eine Probe wurde nach der Sterilisation mit aktiver Erde geimpft, und eine weitere als Kontrolle im offenen Glasgefäß aufbewahrt. Alle Proben wurden in entsprechenden Glasgefäßen bei Zimmertemperatur gehalten, die sterilisierten Gefäße und die Gefäße, welche die bei 105° C getrockneten Proben enthielten, mit einem Wattebausch abgeschlossen. Die Leitfähigkeit wurde nebst den übrigen Faktoren mit der Apparatur meines Instituts (3) gemessen.

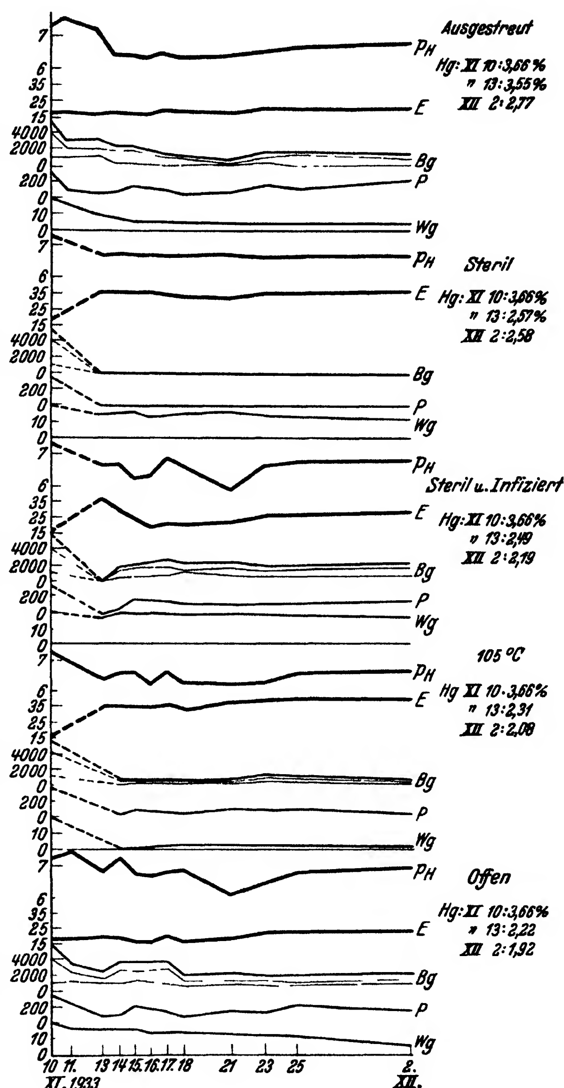


Abb. 7.

E = Elektrische Leitfähigkeit (die Werte sind mit 10^{-5} zu multiplizieren), *Bg* = Bakteriengehalt in Tausenden, *P* = Pilze in Tausenden, *Wg* = Wassergehalt in $^0/_0$, *Hg* = Humusgehalt in $^0/_0$. Der Unterschied zwischen den maximalen und minimalen p_H-Werten von oben nach unten: 1,22, 0,06, 1,01, 0,41, 1,44. Der Unterschied zwischen den maximalen und den minimalen Leitfähigkeitswerten von oben nach unten: 3,48, 2,82, 17,39, 4,81, 7,06.

Abb. 7 stellt nun die Veränderungen dar. Es fällt hier vor allem auf, daß bei allen sterilisierten Proben anfangs die H-Ionenkonzentration und gleichzeitig die Leitfähigkeit der betreffenden Böden zugenommen hat. Diese Erscheinung läßt sich, wie ich schon früher erörtert habe, physiko-chemisch leicht erklären. Im übrigen zeigten in den sterilen Böden nicht nur die p_H-Werte, sondern auch die Werte der Leitfähigkeit nur ganz geringe Abweichungen, die meist noch innerhalb der normalen Fehlergrenzen liegen. Bei Prüfung erwiesen sich diese Proben dann auch als vollkommen keimfrei. Alle übrigen Proben zeigten aber ganz deutliche und regelmäßig verlaufende Schwankungen ihres Mikrobengehalts sowie ihrer Azidität und Leitfähigkeit. Ich möchte aber nochmals darauf hinweisen, daß die Zahl der Bodenbakterien und meistens auch der Pilze im Verhältnis zum Anfangszustand, auch in der unbehandelten Probe, gewisse abnehmende Tendenz zeigt. Diese Abnahme ist sicherlich teilweise durch die abnehmende Bodenfeuchtigkeit zu erklären. Da aber auch der Humusgehalt bei allen biologisch aktiven Proben sich sehr stark vermindert hat, so trägt natürlich auch dieser Umstand zur Verringerung des Bakteriengehaltes bei. Der Humusgehalt der sterilen Probe blieb unverändert. Der Bakteriengehalt der unbehandelten Proben 1 und 5 zeigt zunächst eine starke Abnahme, dann bei Probe 1 eine Depression mit darauffolgender Zunahme, und bei Probe 5 eine vorübergehende Zunahme und eine rasche Abnahme, die durch eine langsam erfolgende Zunahme nicht mehr ausgeglichen werden konnte. Der Bakteriengehalt bleibt aber am Versuchsende bei allen Versuchen immer unter dem Anfangsniveau. Die Schwankungen der p_H-Werte verlaufen bei Probe 1 und 5 parallel mit dem Bakteriengehalt. Ich kann dies nur mit meiner früheren Annahme erklären: Da die Anzahl der anaeroben Bakterien in meinen Versuchsböden verhältnismäßig ganz geringen Schwankungen unterworfen ist, so werden die quantitativen Veränderungen der aeroben Bakterien auf die Zersetzungsvorgänge in den Bodenproben einen entscheidenden Einfluß ausüben.

In den unbehandelten Proben laßt sich auch ein gewisser Antagonismus zwischen den Bodenbakterien und Bodenpilzen beobachten. In vielen Fällen kann man ferner mit Hilfe der Abbildung nachweisen, daß mit der Erhöhung der Bodenazidität auch eine Zunahme der Bodenpilze erfolgt.

Die Werte der Leitfähigkeit zeigen in allen unbehandelten Proben gewisse Schwankungen, die in den offenen und in den geimpften Proben besonders beträchtlich sind, da hier der höhere Wassergehalt, wie das auch die Bakterienkurve zeigt, eine viel intensivere Bakterientätigkeit ermöglicht hat. Da die ausgestreute und die bei 105° C behandelte Probe verhältnismäßig rasch ihrer natürlichen Feuchtigkeit beraubt wurden, finden wir natürlich bei diesen Proben viel kleinere Ausschläge.

Daß diese Schwankungen hauptsächlich durch die Tätigkeit der Bodenmikroorganismen verursacht werden, wird dadurch bewiesen, daß die sterilen Proben alle unverändert geblieben sind. Nach der Sterilisation und auch nach dem Trocknungsprozeß tritt bei allen Proben eine Erhöhung der Leitfähigkeit ein. Gleichzeitig kann man eine Zunahme der H-Ionenkonzentration bzw. eine Erhöhung der Bodenazidität beobachten. Es läßt sich hier ein kausaler Zusammenhang zwischen der Zunahme der H-Ionenkonzentration und der Leitfähigkeit feststellen. Die Schwankungen sind oft, besonders im Anfangsstadium der Versuche, ziemlich bedeutend. Das hängt sicherlich mit der erhöhten Tätigkeit der Mikroorganismen des Bodens zusammen, die in ihrem biologischen Gleichgewicht bei der Entnahme der Proben erheblich gestört werden und auf diesen künstlichen Eingriff jetzt lebhaft reagieren. Später, wenn die Bakterien und Pilze infolge der steten Abnahme des Humusgehaltes und der Bodenfeuchtigkeit ihre Tätigkeit mehr und mehr einschränken müssen, werden natürlich mit dem Abflauen der p_H-Schwankungen auch die Veränderungen der Leitfähigkeit immer geringer. Ich muß allerdings betonen, daß auch die bei der Bodenatmung gebildeten CO_2-Mengen den ganzen biologischen Vorgang merklich beeinflussen können. Zwischen den aeroben und anaeroben Zersetzungsvorgängen im Boden besteht ja ein ausgeprägter Antagonismus, weil die ersten anaeroben Produkte der Verwesung, welche bekanntlich überwiegend sauren Charakter aufweisen, später, wenn genügender Luftzutritt vorhanden ist, allmählich in mehr neutrale Stoffe verwandelt werden. Die entweichende Kohlensäure wird aber von dem Bodenwasser teilweise absorbiert, und die frei werdenden H-Ionen der so entstandenen Hydrocarbonate können ganz erheblich die p_H-Werte beeinflussen. Werden aber mit der Verarbeitung der Humusstoffe die sauren Übergangsprodukte weniger, so muß natürlich schließlich eine Zunahme der p_H-Werte, d. h. eine Erniedrigung der Azidität, erfolgen. Da jedoch infolge der Zersetzungstätigkeit der Bodenmikroorganismen auch mehr und mehr anorganische Kationen und Anionen frei gemacht werden, welche die elektrometrisch meßbare Gesamtsalzkonzentration des Bodens erheblich erhöhen, so wird schließlich, wie dies auch die Versuche zeigen, parallel mit der Erhöhung der p_H-Werte auch eine Erhöhung der Leitfähigkeit erfolgen.

Es soll natürlich nicht geleugnet werden, daß in der freien Natur, hauptsächlich infolge der Einwirkung des Niederschlagswassers, ebenfalls gewisse Änderungen in der chemischen und physikalischen Beschaffenheit des Bodens eintreten können, wobei freie H-Ionen entstehen und infolge der Auswaschung sich auch die Gesamtsalzkonzentration des Bodens ändern kann. Diese Versuche haben aber gezeigt, daß in allen Fällen, wo man die erwähnte Wirkung des Wassers durch entsprechende Versuchsanordnung ausschaltet, fast alle Veränderungen des Bodens, welche infolge der

biologischen Zersetzungsarbeit entstehen, vollkommen stillgelegt werden können, falls die Mikroorganismenwelt des Bodens abgetötet wird. Aus diesen Ergebnissen kann man auch folgern, daß namentlich im Waldboden die Veränderungen der chemischen und physikalischen Beschaffenheit des Bodens zum überwiegenden Teil auf biologische Ursachen zurückzuführen sind. Die unmittelbare Wirkung der anorganischen Umweltfaktoren dürfte dabei, namentlich während kürzerer Zeitperioden, ziemlich bedeutungslos sein. Da in der freien Natur eine längere Existenz von sterilen Böden vollkommen undenkbar ist, so müßte man der Frage, in welchem Maße die biologische Wirkung von der Einwirkung der anorganischen Umweltfaktoren getrennt werden können, durch weitere Experimente, viel mehr als das bisher geschehen ist, nahe treten.

Auch diese Versuche haben bestätigt, daß durch den Trocknungsprozeß, welchem die Bodenproben vor ihrer Untersuchung gewöhnlich unterworfen werden, eine Fixierung der Bodenazidität nicht erfolgen kann, und daß selbst die Trocknung bei 105° C die Tätigkeit der Bodenmikroben und die damit verbundenen Änderungen der Leitfähigkeit und Bodenazidität durchaus nicht zu hindern vermag.

Es wurden auch die Ergebnisse der früheren Versuche bezüglich der hohen Anpassungsfähigkeit der Bodenmikroben an die Trockenheit des Bodens bestätigt. Es zeigt sich, daß die Bodenmikroben noch bei einem Feuchtigkeitsgehalt von 2 bis 3 % aktiv sind und infolgedessen ihre Zersetzungsarbeit, wenn auch in beschränktem Maße, durchführen.

Die Untersuchungen haben bewiesen, daß nicht nur die Bodenazidität, sondern auch die Gesamtsalzkonzentration der Böden einem ununterbrochenen Wechsel unterworfen ist, der durch die Tätigkeit der Bodenmikroben herbeigeführt und durch vollständige Inaktivierung derselben stillgelegt wird.

Ich möchte noch kurz darauf hinweisen, daß die Leitfähigkeit des Bodens auch durch dessen jeweiligen Wassergehalt stark beeinflußt wird. Man muß daher bei der Berechnung der Leitfähigkeitswerte die Bodenfeuchtigkeit berücksichtigen, um auch hier den physiko-chemischen Anteil von dem sicherlich weitaus größeren biologischen Anteil zu trennen. Am besten ist es, alle Bodenproben bei der Untersuchung mit gleichen Wassermengen zu behandeln.

Ich möchte noch zum Schluß darauf hinweisen, daß man die chemisch-physikalische Konstitution eines Bodens richtig nur dann erfassen und verstehen wird, wenn man die lebende Natur desselben und den damit zusammenhängenden dynamischen Charakter des Bodenlebens vollauf zu würdigen versteht. Daß physiko-chemische und namentlich auch kolloidchemische Veränderungen in den Böden auch ohne biologische Zersetzungsarbeit oder, besser gesagt, auch ohne Mikrobentätigkeit zustande kommen kann, ist unzweifelhaft. Diese Veränderungen sind aber nach meiner Ansicht geringfügig im

Verhältnis zu den großen durchgreifenden biologischen Reaktionen, die sich in den Bodenschichten abspielen, aus denen die Pflanzen ihre Nährstoffe entnehmen.

Ich bin der Ansicht, daß der alten Auffassung, welche den Boden im statischen Sinne als ein Gemenge von chemischen Verbindungen aufgefaßt hat, nicht mehr gänzlich beigepflichtet werden kann, *daß der Boden vielmehr eine lebende Materie ist, deren Untersuchung nur dann zum Ziele führt, wenn man die biologischen Grundlagen und die dynamische Natur des gesamten Problems durch Anwendung einer entsprechenden Methodik berücksichtigt.*

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Durch eine einfache rechnerische Methode, die in dieser Arbeit angegeben wird, kann man die Veränderungen, welche in den p_H-Werten der Böden durch physiko-chemische Einflüsse bzw. durch die Veränderungen des Wassergehalts hervorgerufen werden, von den biologischen rasch und einfach getrennt nachweisen.

2. Die physiko-chemischen Schwankungen der Bodenazidität, welche durch die Veränderungen des Wassergehalts hervorgerufen werden, sind, falls der Feuchtigkeitsgehalt der Bodenproben zwischen 5 und 25 % schwankt, im Verhältnis zu den biologisch bedingten Veränderungen derart bedeutungslos, daß man sie bei überwiegenden biologischen Zielen der p_H-Untersuchungen vernachlässigen kann. Diese Feststellung gilt besonders dort, wo man mit dem festen Verhältnis 1 : 2 arbeitet, bei dem die eben erwähnten Unterschiede meistens kleiner als $p_H = 0{,}1$ bleiben.

3. Sind größere Feuchtigkeitsschwankungen vorhanden, oder soll ein Vergleich der p_H-Bestimmungen bei verschiedenem Wassergehalt der Böden ermöglicht werden, so untersucht man am zweckmäßigsten die Bodenproben sofort nach der Entnahme und bestimmt dabei den Wassergehalt. Wird dabei auch das Verhältnis der Bodensuspensionen angegeben, bei welchen die Bestimmung der p_H-Werte erfolgte, so kann man mit Hilfe der in Punkt 1 erwähnten rechnerischen Methode die einzelnen p_H-Werte ganz gut miteinander vergleichen.

4. Weder Trocknung bei Zimmertemperatur noch Trocknung im Vakuum unterbinden die Tätigkeit der Mikroben und die damit verbundenen Veränderungen der p_H-Werte nach der Entnahme der Bodenproben. Die Anwendung dieser Methoden macht daher die p_H-Bestimmung, falls man damit einige Tage lang wartet, unsicher. Nur die Sterilisation in heißem Dampfe führt die Inaktivierung des Bodens herbei.

5. Auch nach den Ergebnissen der hier mitgeteilten umfangreichen Versuche sind die Veränderungen der p_H-Werte fast ausschließlich auf die Tätigkeit der Bodenmikroben zurückzuführen.

6. Auch die Leitfähigkeit bzw. die Gesamtsalzkonzentration der Böden ist beträchtlichen Schwankungen unterworfen, die vorwiegend auf die Tätigkeit der Bodenmikroben zurückzuführen sind. Durch gründliche Sterilisation kann man auch die Schwankungen der Leitfähigkeit verhindern.

7. Zwischen den Schwankungen der Azidität und der Leitfähigkeit des Bodens und den Schwankungen der Zahl der Bodenbakterien und Bodenpilze konnten klare Zusammenhänge nachgewiesen werden. Bei Bodenuntersuchungsmethoden sollte man daher die lebende Natur des Bodens und die Dynamik des ganzen Fragenkomplexes stets durch die Anwendung einer entsprechenden biologischen Untersuchungsmethode neben den üblichen physiko-chemischen Methoden berücksichtigen.

Literatur.

1) *D. Fehér*, diese Zeitschr. **3**, 609, 1932. — 2) *G. Deines* u. *R. Kleinschmit*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung und Düngung (A) **25**, 257, 1932; **28**, 67, 1933; **31**, 303, 1933; **32**, 1, 1933; diese Zeitschr. **4**, 271, 1933; Mitt. f. Forstwirtsch. u. Forstwiss. 1933, S. 159; *C. Dreyspring* u. *F. Heinrich*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung und Düngung (A) **20**, 155, 1931. — 3) *D. Fehér*, Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin, Springer, 1933. — 4) *D. Fehér* u. *Z. Kiszely*, Arch. f. Pflanzenbau **9**, 1, 172, 1932. — 5) *D. Fehér*, diese Zeitschr. **4**, 447, 1933. — 6) *R. Pistor*, Centralbl. f. Bakt. II, **80**, 169, 378, 1930. — 7) *D. Fehér*, Zeitschr. f. Pflanzenernährung und Düngung (A) **33**, 320, 1933. — 8) *E. Pantanelli*, Centralbl. f. Bakt. II, **42**, 439, 1914.

(Aus dem Botanischen Institut der kgl. ungar. Hochschule für Berg- und Forstingenieure in Sopron.)

Untersuchungen über die Schwankungen der Bodenatmung.

Von

D. Fehér.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. März 1934.)

In ausgedehnten Versuchen habe ich in Mittel- und Nordeuropa sowie in der ungarischen Tiefebene die CO_2-Produktion einer ganzen Reihe von Waldböden, teilweise in längeren Zeitperioden, untersucht; die Ergebnisse sind in dem Kapitel über die CO_2-Atmung der Waldböden meines Buches (1) ausführlich dargestellt. Es war mir dabei klar geworden, daß Wesen und Bedeutung dieser überaus wichtigen Funktion des Waldbodens nur dann richtig erfaßt werden können, wenn man deren komplexe Natur und den Zusammenhang mit ihren organischen und unorganischen Umweltfaktoren, hauptsächlich aber mit der mikrobiologischen Tätigkeit der Böden, zu erforschen trachtet.

Auf Einzelheiten der Ergebnisse will ich hier nicht näher eingehen. Um jedoch die Problemstellung der weiteren Forschungen verstehen zu können, sei ganz kurz folgendes erwahnt: Die früheren Ergebnisse haben in großen Zügen den kausalen Zusammenhang zwischen dem Mikrobengehalt der Waldböden einerseits, der Bodenatmung und dem Kohlensäuregehalt der Waldluft andererseits erwiesen. Wir konnten diese Forschungen aber nur als eine vorläufige Orientierung betrachten. Abgesehen davon, daß unsere Methodik seinerzeit noch in der Entwicklung begriffen war, waren auch die Beobachtungsperioden von derart kurzer Dauer, daß man aus ihnen keine endgültigen und auch in quantitativer Hinsicht exakten Schlußfolgerungen ableiten konnte. Hierzu mußte die Periodizität sowie die ganze komplexe Erscheinung der Mikrobentätigkeit des Waldbodens durch längere Zeitperioden untersucht werden, eine Arbeit, die erst nach dem Abschluß der vorläufigen Forschungen auf mehreren Versuchsflächen in Angriff genommen wurde.

Untersuchungsmethodik.

Wir haben folgende wichtigeren Biofaktoren untersucht: 1. Den CO_2-Gehalt der Waldluft in 3 m Höhe, 2. die Bodenatmung (CO_2-Produktion g/qm u. Std.), 3. den Bakteriengehalt des Waldbodens, 4. die Anzahl der Pilze, 5. die Bodenazidität, 6. den Humusgehalt und 7. den Wassergehalt des Bodens. Um Wiederholungen zu vermeiden, möchte ich auf den methodischen Teil meines Buches (1) verweisen, in dem die methodischen Einzelheiten ausführlich beschrieben sind.

Die Beobachtungen erfolgten monatlich dreimal, an jedem zehnten Tage. Die Bestimmung der Bodenatmung und des CO_2-Gehalts der Waldluft

erfolgte mit der angegebenen Apparatur an zwei Parallelproben und zwar stets in den Mittagsstunden, wo die Bodenatmung gewöhnlich ihren Höhepunkt erreicht. Es sei noch ausdrücklich betont, daß bei Bestimmung der Bodenatmung der CO_2-Gehalt der Waldluft in der Bodenglocke vor der Exposition genau bestimmt und die Bodenatmungswerte unter Berücksichtigung dieser Messungsergebnisse ermittelt wurden.

Beschreibung der Versuchsflächen.

Es wurden der Boden eines Nadelholzbestandes (Versuchsfläche 17) und eines Laubholzbestandes (Versuchsfläche 20b) untersucht. Als Kontrollfläche diente die seit Jahren unberührt belassene ständige Kontrollfläche des Instituts im botanischen Garten der Hochschule (Versuchsfläche 24). Tabelle I gibt eine kurze Charakteristik der drei Versuchsflächen.

Tabelle I.
Beschreibung der Versuchsflächen.

Nr	Kurze Ortsbeschreibung der Versuchsfläche	Geologischer Untergrund	Hohe uber Meeresspiegel m	Exposition	Bodentyp	Baumart, Mischungsverhältnis	Alter	Bestandesschluß
17	Sopron, Botanischer Garten	Badener Tegel	216	—	Braunerde	*Picea excelsa* 0,9 *Pinus nigra* 0,1	30	0,9
20 b	Sopron, Váris	Muskovitgneis	320	—	Braunerde	*Quercus robur* 1,0	45	0,9
24	Sopron, Botanischer Garten	Badener Tegel	216	—	Braunerde	Brache	—	—

Besprechung der Untersuchungsergebnisse auf den einzelnen Versuchsflächen.

Versuchsfläche 17. Dieser Bestand wurde schon im Jahre 1928, 12 Monate lang, untersucht; das Ergebnis wurde bereits eingehend besprochen (1). Die neueren Ergebnisse zeigt Abb. 1. In ihr sind die Werte von R_1 [vgl. (1)], also die Werte des Produktes: Bodenfeuchtigkeit in Prozenten × Bodentemperatur (jeweilige Bodentemperatur + 10° C), besonders angegeben.

Wir sehen zunächst eine auffallende und in meinen früheren Arbeiten schon öfters erwähnte Übereinstimmung zwischen den Änderungen des Bakteriengehalts und dem Faktorenkomplex R_1. Es zeigt sich weiter, daß die Änderungen des Bakteriengehaltes und der Bodenatmung im großen und ganzen, von kleineren Schwankungen abgesehen, parallel verlaufen. Man kann auch an vielen Stellen einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen den Änderungen der R-Werte und denen der Bodenatmungswerte feststellen, was ohne weiteres verständlich ist, da die Bodenatmung nicht nur eine unmittelbare Folge des Bakteriengehalts ist, sondern auch in ihrem Mechanismus durch die Bodentemperatur stark beeinflußt wird. Stets erfolgt die Kulmination der Bodenatmung und der Bakterienkurve gleichzeitig in den Sommermonaten.

Die Bodenpilze zeigen ihr Maximum ebenfalls in den Sommermonaten und ein kleineres Maximum in den Herbstmonaten. Es kommt auch, wie in Abb. 1, ein drittes Maximum in den Frühjahrsmonaten vor, das wohl mit dem großen jahreszeitlichen Feuchtigkeitsgehalt des Bodens in Verbindung steht. Diese drei Maxima können voneinander stark abweichen, und es kann das Frühjahrs- oder das Herbstmaximum stärker entwickelt sein als das Sommermaximum. Das Verhalten dieser Organismengruppe ist offenbar von dem jeweiligen

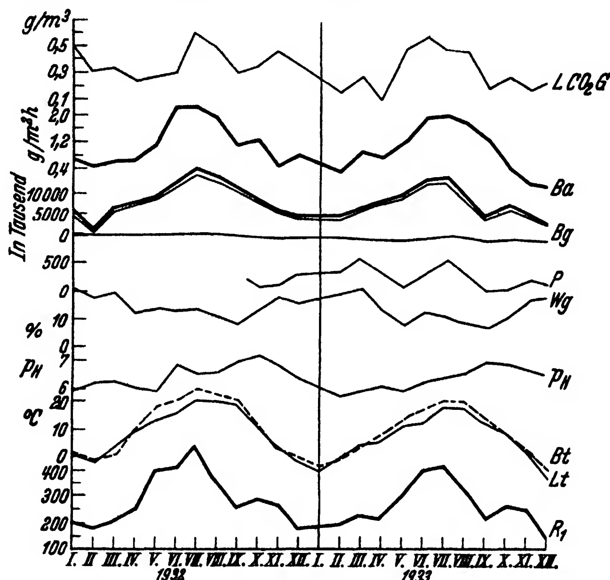


Abb 1.

LCO_2-G = Luftkohlensäuregehalt, *Ba* = Bodenatmung, *Bg* = Bakteriengehalt, *P* = Pilze, *Wg* = Wassergehalt, *Bt* = Bodentemperatur, *Lt* = Lufttemperatur, R_1 = Bodentemperatur × Wassergehalt.

Wassergehalt des Bodens viel mehr abhängig als die Vermehrung und die Tätigkeit der Bodenbakterien, wie aus Abb. 1 hervorgeht[1]. Man kann auch einen gewissen Antagonismus zwischen den p_H-Werten und der Zahl der mikroskopischen Bodenpilze feststellen.

Man kann nachweisen, daß die verschiedenen Kulminationen der Pilzkurve sich auch stellenweise in der Gestaltung der Bodenatmungskurve fühlbar machen. Das gilt namentlich für die Frühjahrs- und Herbstmonate, wo Zahl und Wirkung der Bakterien gewöhnlich noch gering sind. Es kann andererseits auch vorkommen, daß die Zahl

[1] Um das Verhalten der Bodenpilze gegen die Bodenfeuchtigkeit und die Bodentemperatur näher aufzuklären, sind weitere Versuche eingeleitet, über die ich später berichten werde.

der Bodenpilze in den Sommer- bzw. in den Spätfrühlingsmonaten vorübergehend eine Depression erleidet, deren Einwirkung auf die Bodenatmung, infolge des überwiegenden Einflusses der Bakterientätigkeit, nicht eindeutig zum Ausdruck kommen kann.

Über die Änderungen der p_H-Werte und den Zusammenhang mit dem jeweiligen Wassergehalt des Bodens habe ich schon früher ausführlich gesprochen (2). Man kann ferner einen gewissen Zusammenhang zwischen Bakteriengehalt und p_H-Werten feststellen, indem die höchsten p_H-Werte entweder mit der maximalen Entwicklung des Bakteriengehalts zusammentreffen oder etwas später nach dem jeweiligen Bakterienmaximum auftreten.

Die Kurven der Bodenatmung und des Kohlensäuregehalts der Waldluft, dieser in einer Höhe von ungefähr 3 m gemessen, verlaufen fast vollkommen parallel. Etwaige Schwankungen und Abweichungen können nur dann erklärt werden, wenn wir neben der Bodenatmung auch die Assimilationstätigkeit des Bestandes und der Bodenpflanzen heranziehen; denn der jeweilige CO_2-Gehalt der Waldluft ist fast immer das Ergebnis des Zusammenspielens zwischen der Bodenatmung und zwischen dem CO_2-Verbrauch durch den Bestand. Ich habe schon früher darauf hingewiesen und auch ausreichendes Beweismaterial dafür geliefert, daß infolge der langsamen Diffusion der CO_2 der CO_2-Gehalt der Waldluft in größeren Höhen durch die jeweilige Bodenatmung nicht mehr erheblich erhöht wird. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen aber, daß der CO_2-Gehalt der nur 2 bis 3 m über dem Boden liegenden Luftschichten bedeutende Schwankungen zeigen kann. Das Minimum fällt gewöhnlich mit dem Minimum der Bodenatmung in den Wintermonaten zusammen, es kann aber auch vorkommen, daß die Depression sich erst im Spätwinter (Januar, Februar) einstellt. Das Maximum entfällt im großen und ganzen auf die Sommermonate. Stets kann man aber deutlich in den Frühjahrs- und in den Herbstmonaten je ein kleineres Maximum des CO_2-Gehalts der Waldluft feststellen, das nach meiner Ansicht nur dadurch erklärt werden kann, daß bei sinkender Lufttemperatur die Assimilationstätigkeit, also der CO_2-Verbrauch des Bestandes, stark abgenommen hat. Da aber die Bodenatmung, außer an den ganz kalten Tagen, nie ganz aufhört, so werden die gebildeten CO_2-Mengen nicht mehr verbraucht, so daß ein gewisser Überschuß entsteht. Setzt dann die Assimilation ein, oder wird die Bodenatmung infolge der niedrigen Bodentemperatur stark verringert, so kann man immer eine starke Abnahme des CO_2-Gehalts der Waldluft beobachten. Die relative und absolute Höhe des CO_2-Gehalts der Waldluft wird daher außer durch die Bodenatmung auch durch den Verbrauch seitens der Bestände erheblich beeinflußt. Da jedoch auch die Geschwindigkeit der Diffusion

der CO_2 durch die jeweilige Lufttemperatur und durch den Wind stark beeinflußt wird, so ist es klar, daß die Kurve der Luftkohlensäure sich nicht in allen Einzelheiten mit der der Bodenatmung decken kann.

Versuchsfläche 20b. Diese Versuchsfläche steht seit Juni 1932 unter Beobachtung, die Ergebnisse zeigt Abb. 2. Sie bestätigen im allgemeinen die auf Versuchsfläche 17 gefundenen Zusammenhänge. Es wurde auch der Humusgehalt untersucht, dessen Änderungen früher schon (1) ausführlich besprochen wurden. Das Maximum des Humusgehaltes fällt stets mit dem Maximum der Bakterienkurve zusammen. Die Humuskurve ist auch in gewissem Sinne der quantitativen Entwicklung der Bodenpilze gegenläufig. Das ist leicht erklärlich, da durch die erhöhte Bakterientätigkeit in den Sommermonaten die Humusreserve des Waldbodens allmählich erschöpft wird und infolgedessen dem Maximum des Bakteriengehalts eine Abnahme des Humusgehalts entsprechen muß.

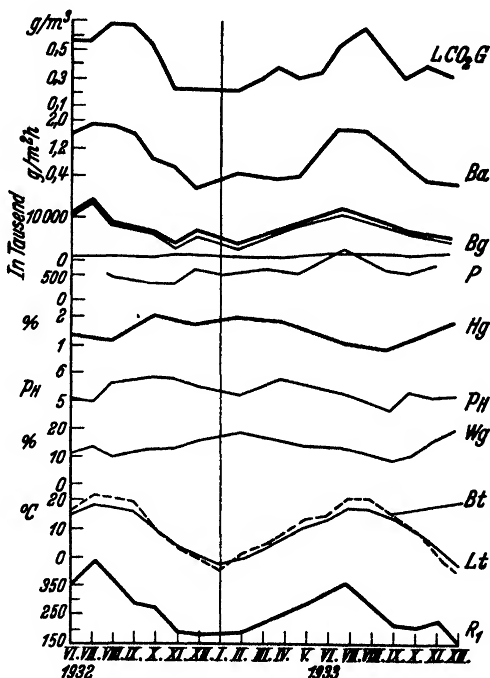


Abb. 2.

L CO_2-*G* = Luftkohlensäuregehalt, *Ba* = Bodenatmung, *Bg* = Bakteriengehalt, *P* = Pilze, *Hg* = Humusgehalt, *Wg* = Wassergehalt, *Bt* = Bodentemperatur, *Lt* = Lufttemperatur, R_1 = Bodentemperatur × Lufttemperatur.

Die höchste Zahl der Bodenpilze stellt sich auch hier in den Sommermonaten ein, sie zeigt aber auch im Winter ein kleineres Maximum. Das Frühjahrsmaximum, welches in dem Fichtenwaldboden deutlich festzustellen war, ist hier ganz unbedeutend, was durch die verschiedene Bodenfeuchtigkeit der beiden Waldtypen in den Frühlingsmonaten zu erklären ist. Der Fichtenwaldtyp zeigt gerade im Frühling ein stärkeres Ansteigen des Wassergehalts. Auch diese Beobachtung deutet auf eine höhere Empfindlichkeit der Bodenpilze dem Wassergehalt des Bodens gegenüber hin. Die Änderungen der p_H-Werte verlaufen im allgemeinen nach den schon öfters erörterten Zusammenhängen.

Versuchsfläche 24. Der Boden dieser Versuchsfläche ist Freilandboden. Seine Beobachtung sollte den Vergleich der Tätigkeit eines Freilandbodens mit der biologischen Aktivität unserer Waldböden ermöglichen. An anderer Stelle habe ich darauf hingewiesen, daß diese Beobachtungen vom Gesichtspunkte des Kahlschlagsproblems aus auch für die praktische Fortwirtschaft eine besondere Bedeutung haben (3). Hier sollen die Ergebnisse nur nach allgemeinen theoretischen Gesichtspunkten erörtert werden. Die Versuchsfläche steht seit November 1930 unter ständiger Beobachtung. Die Bodenatmung wurde jedoch erst seit dem Januar 1932 regelmäßig gemessen (siehe Abb. 3).

Die mikrobiologischen Vorgänge verlaufen genau im gleichen Sinne wie in den Waldböden. Die Änderungen des Bakteriengehaltes

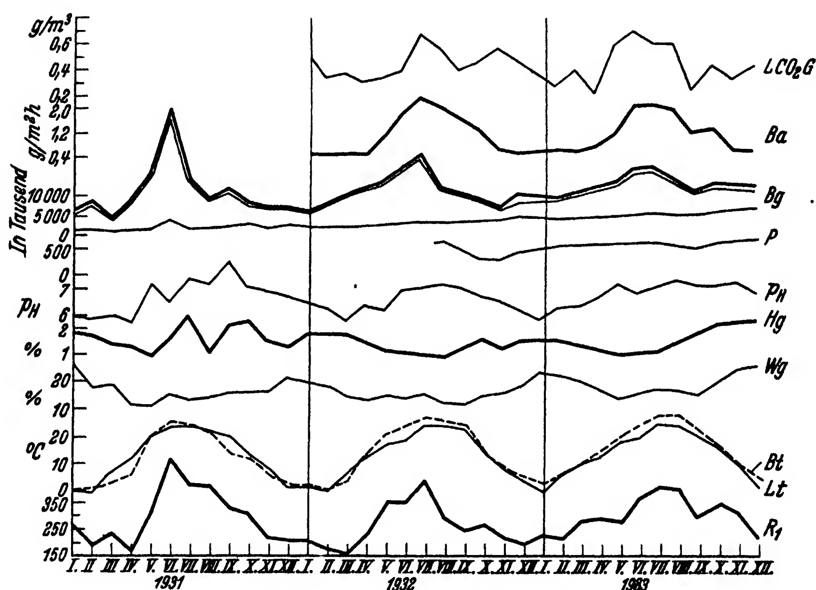


Abb. 3.
L CO_2-*G* = Luftkohlensäuregehalt, *Ba* = Bodenatmung, *Bg* = Bakteriengehalt, *P* = Pilze, *Hg* = Humusgehalt, *Wg* = Wassergehalt, *Bt* = Bodentemperatur, *Lt* = Lufttemperatur, R_1 = Bodentemperatur × Lufttemperatur.

werden daher auch in den Freilandböden durch das Zusammenwirken von Bodentemperatur und Bodenfeuchtigkeit bestimmt. Das gilt natürlich nur dann, wenn das biologische Gleichgewicht nicht durch die künstlichen Eingriffe der Menschenhand gestört wird. Das Maximum des Bakterienwachstums liegt auch hier regelmäßig in den Sommermonaten, also in der Periode der höchsten Bodentemperatur. Die in der Literatur so oft erwähnte Maxima im Frühjahr und im Herbst treten hier ganz vereinzelt und nur dann auf, wenn eine ganz besondere Konstellation der bereits erwähnten beiden bestimmenden Faktoren

diese Entwicklung ermöglicht oder notwendig macht. Diese beiden „fakultativen“ Maxima, die in vielen Fällen auch in Waldböden nachzuweisen sind, bleiben aber an Stärke und Mächtigkeit immer beträchtlich hinter den Sommermaxima zurück. Die angebliche Sommerdepression in den Freiland- und Ackerböden wird durch die starke Austrocknung dieser Böden in den Sommermonaten verursacht.

Es ist aber kein Grund vorhanden, eine übermäßige Austrocknung dieser Freilandböden in den Sommermonaten anzunehmen. Es wurde einwandfrei bewiesen (3, 4), daß der Wassergehalt von Waldböden schon in einer Tiefe von 15 bis 20 cm, also im Niveau der intensivsten Bakterientätigkeit, stets geringer ist als die Feuchtigkeit der Freilandböden; von einer übermäßigen Austrocknung dieser kann gar keine Rede sein. Die Verdunstung eines Waldbestandes ist viel bedeutender als die der Pflanzendecke dieser Freilandböden. Die üppige Bodenvegetation, die sich auf den Freilandböden regelmäßig einstellt, schützt auch deren oberste Schichten vor einer übermäßigen Austrocknung. Die Sommerdepression, die in der Literatur so oft angeführt wird, tritt nur auf den Freilandböden auf, die infolge der landwirtschaftlichen Nutzung gerade in den heißesten Sommermonaten von ihrer schützenden Pflanzendecke entblößt werden. Diese Erscheinung entspricht aber in keiner Hinsicht dem regelmäßigen Verlauf des Mikrobenlebens der Freilandböden. *Sie ist ein Kunsteffekt, der sich infolge der künstlichen Eingriffe des landwirtschaftlichen Betriebes einstellt.* Das Gesagte wird durch meine früheren und jetzigen Beobachtungen einwandfrei bestätigt.

Auch auf dieser Versuchsfläche, also im Freilandboden, verläuft das Bodenleben im großen und ganzen ähnlich wie in den Waldböden. Auch hier kann man den klaren Zusammenhang zwischen der Bodenatmung und dem CO_2-Gehalt der unteren Luftschichten beobachten.

Die quantitative Darstellung der Zusammenhänge zwischen den Änderungen der wichtigsten Biofaktoren des Waldbodens.

Bei der Bearbeitung des Untersuchungsmaterials stellte sich heraus, daß in gewissem Grade die Möglichkeit einer mathematischen Behandlung gegeben ist. Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei aber schon hier ausdrücklich betont, daß ich dieser nur eine empirische Bedeutung beimesse. Sie dient ausschließlich dazu, Zusammenhänge, die durch mehrjährige Beobachtungen ermittelt wurden, mit großer Annäherung auch quantitativ festzustellen. Ich lege das Hauptgewicht darauf, zu erforschen, ob ein mathematischer Ausdruck der fraglichen Probleme auf Grund der Untersuchungsergebnisse überhaupt möglich ist. Von mathematischer Exaktheit kann natürlich keine Rede sein. Die mathematische Formulierung dient nur dazu, die innere Struktur und quantitativen Zusammenhänge der vorliegenden Fragenkomplexe in ihrer Dynamik

darzustellen. Für die endgültige Entscheidung ist der experimentelle Nachweis unbedingt notwendig. Über diesen Teil unserer Forschungen werde ich aber im zweiten Teil dieser Arbeit berichten.

1. Der quantitative Zusammenhang zwischen der Bodenatmung und dem Bakteriengehalt. Ich habe schon früher versucht, den periodischen Verlauf des Bakterienlebens im Waldboden mathematisch auszudrücken (5) und in der *Robertson*schen Formel die Möglichkeit gefunden,

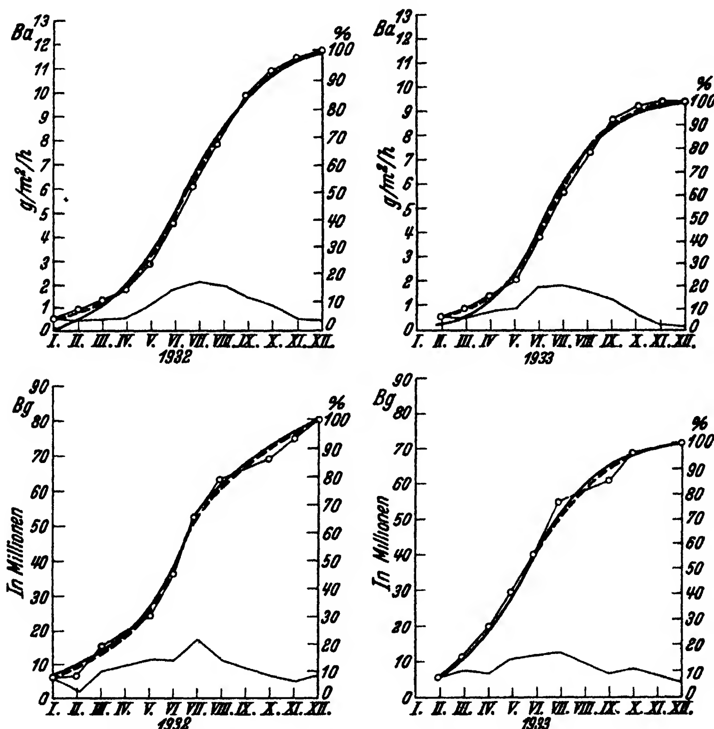


Abb. 4.
---- eingelegte Kurve, ——— berechnete Kurve.

den jahreszeitlichen Verlauf des Bakterienwachstums mit großer Annäherung quantitativ zu charakterisieren. Hier und im folgenden gebrauche ich absichtlich den Ausdruck „annähernd", da infolge der komplexen Erscheinungsformen der Mikrobentätigkeit im Waldboden und infolge der vielen Unzulänglichkeiten der Untersuchungsmethoden, die nicht alle Faktoren quantitativ zu erfassen erlauben, bei Untersuchungen in der freien Natur eine vollkommene Exaktheit vorderhand noch nicht möglich ist. Wegen des durch diese und frühere Untersuchungen nachgewiesenen weitgehenden Parallelismus zwischen der quantitativen Entwicklung der Bodenbakterien und den quantitativen

Änderungen der Bodenatmung habe ich zunächst versucht, auch den jahreszeitlichen Verlauf der Bodenatmung in dem erwähnten Sinne zu formulieren. Bezüglich näherer Einzelheiten unserer Berechnungsmethodik verweise ich auf die frühere Arbeit (5), in der das Nötige bereits mitgeteilt ist. Auch hier wurde die Summe aller Bakterienzahlen und aller Bodenatmungswerte als 100 angenommen und sodann zu den aufgetragenen Einzelpunkten die empirische Kurve eingelegt. Auf Grund der Formel wurden sodann die Werte von k ermittelt und daraus der durchschnittliche Wert von k gebildet. Wir haben dann mit diesem durchschnittlichen Wert auf Grund der Formel die Werte von yk gebildet und die so berechnete Kurve ebenfalls zum Vergleich eingezeichnet. Abb. 4 und die zugehörige Tabelle II zeigen, daß auch die Bodenatmung bzw. ihr jahreszeitlicher Verlauf mit großer Annäherung

Tabelle II.

Der quantitative Zusammenhang zwischen den Werten der Bodenatmung und des Bakteriengehalts.

$$\log \frac{y}{A - y} = k\,(x - x_1)$$

x	y %	k	y'	Δ	x	y %	k	y'	Δ
1932	Bg x_1 = 6,6				1932	Ba x_1 = 6,3			
1	6,26	0,2216	7,80	— 0,54	1	4,08	0,2436	1,87	+ 2,21
2	7,67	0,2395	8,76	— 1,06	2	7,06	0,2434	4,31	+ 2,75
3	17,10	0,2078	13,01	+ 4,09	3	10,83	0,2548	8,15	+ 1,68
4	—	—	—	—	4	14,80	0,2920	14,78	+ 0,02
5	30,42	0,2764	30,40	+ 0,02	5	23,42	0,3223	25,41	— 1,99
6	43,70	0,3670	45,36	— 1,60	6	38,50	0,3389	40,20	— 1,70
7	64,15	0,3596	60,60	+ 3,45	7	56,20	0,2697	56,30	— 0,10
8	77,80	0,3200	74,15	+ 3,65	8	72,36	0,2988	71,90	+ 0,40
9	—	—	—	—	9	83,90	0,2989	83,50	+ 0,40
10	86,00	0,2127	90,92	— 4,92	10	92,60	0,3226	90,90	+ 1,70
11	92,10	0,2272	95,10	— 3,00	11	96,70	0,3330	95,31	+ 1,39
12	100,00	—	100,00	0	12	100,00	—	100,00	0
Durchschnitt:		0,2702					0,2925		
1933	Bg x_1 = 5,6				1933	Ba x_1 = 6,5			
1	—	—	—	—	1	—	—	—	—
2	6,93	0,3144	8,25	— 1,32	2	3,52	0,3196	1,87	+ 1,68
3	17,11	0,2635	15,47	+ 1,64	3	8,86	0,2890	4,30	+ 4,56
4	26,61	0,2758	25,98	+ 0,63	4	14,00	0,3151	10,05	+ 3,95
5	40,65	0,2716	40,35	+ 0,30	5	22,36	0,3590	21,35	+ 1,05
6	57,40	0,3234	56,50	+ 0,90	6	40,20	0,3465	39,37	+ 0,83
7	74,70	0,3357	71,45	+ 3,25	7	60,60	0,3739	60,75	— 0,15
8	—	—	—	—	8	78,20	0,3695	78,90	— 0,70
9	83,85	0,2109	90,20	— 6,35	9	91,50	0,4127	89,60	+ 1,90
10	94,50	0,2802	94,70	— 0,20	10	98,10	0,4896	95,70	+ 2,40
11	—	—	—	—	11	99,60	0,5319	98,90	+ 0,70
12	100,00	—	100,00	0	12	100,00	—	100,00	0
Durchschnitt:		0,2844					0,3807		

nach der *Robertson*schen Formel verläuft. Man kann auch hier den bereits erwähnten Parallelismus zwischen der Entwicklung der Bodenatmung und dem Bakterienwachstum im Waldboden feststellen.

Die Anzahl und die Tätigkeit der Bakterien und sonstige Mikroorganismen des Bodens wird hauptsächlich durch die jeweilige Bodentemperatur und Bodenfeuchtigkeit geregelt. Um die komplexe Wechselwirkung dieser beiden Biofaktoren wenigstens annäherungsweise zu charakterisieren, habe ich ihr Produkt gebildet und den zahlenmäßigen Wert desselben mit R_1 bezeichnet. Schon in meiner diesbezüglichen ersten Arbeit konnte ich zeigen, daß zwischen den Änderungen dieses Faktorenkomplexes und denen des Bakteriengehalts ein klar erkennbarer Zusammenhang besteht, welcher durch eine Parabel vierter Ordnung mit sehr guter An-

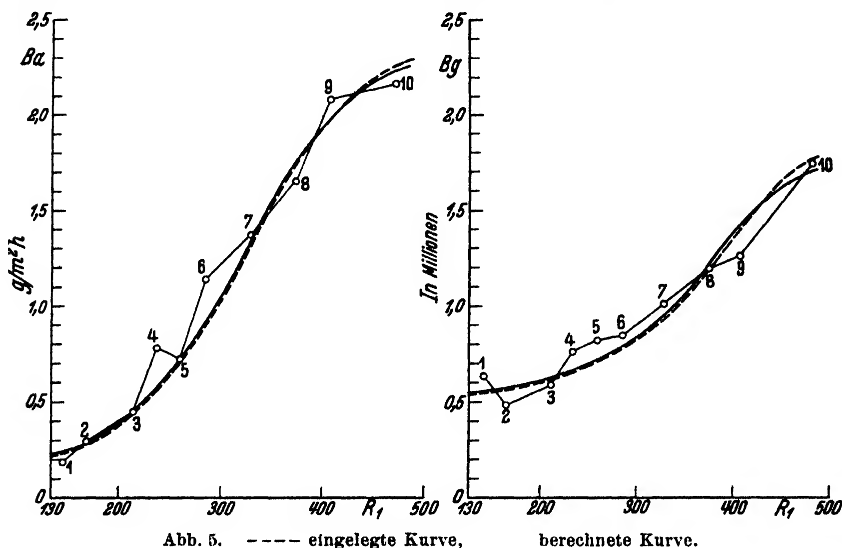


Abb. 5. ---- eingelegte Kurve, berechnete Kurve.

näherung ausgedrückt werden kann. Ich habe, wie ich schon seinerzeit betont habe, auf eine besonders spezialisierte mathematische Ausdrucksweise vorläufig noch kein Gewicht gelegt. Der jetzt erwähnte Zusammenhang könnte nämlich auch mit logarithmischen Gleichungen ausgedrückt werden. Da mein Bestreben vorläufig dahin geht, die Möglichkeit einer mathematischen Darstellung dieser Zusammenhänge überhaupt zu erforschen, so habe ich die Parabelgleichungen gewählt, weil sie unseren Zwecken vorläufig gut entsprechen und viel leichter als die Exponentialgleichungen zu handhaben sind. Erst später, wenn Untersuchungsergebnisse in noch größerem Maßstabe vorliegen und die Untersuchungsmethoden auf Grund der Erfahrungen den besonderen Zwecken mehr angepaßt werden können, wird die Zeit kommen, die endgültige Formulierung dieser Gesetzmäßigkeiten zu versuchen.

Neben dem Bakteriengehalt habe ich auch den Zusammenhang zwischen den Werten der Bodenatmung und den R_1-Werten mathematisch dargestellt (Abb. 5 und Tabelle III). Man sieht, daß beide Biofaktoren vorläufig noch unter ihrem Optimum stehen, was darauf

zurückzuführen ist, daß, wie ich schon früher betont habe, das Optimum des Bakterienwachstums infolge der niedrigen Bodentemperaturen in unseren mitteleuropäischen Waldböden gewöhnlich nicht vorhanden ist. Im übrigen werden die Zusammenhänge durch eine Parabel vierter Ordnung ausgedrückt, wodurch unsere früheren Ergebnisse im großen und ganzen bestätigt werden. Beide Kurven verlaufen annähernd parallel. Bezüglich der Bodenatmung muß ich aber bemerken, daß sie nicht nur von der Zahl der Bodenbakterien, sondern auch von dem Verhältnis der aeroben zu den anaeroben Bakterien sowie von der Intensität der Zersetzungsarbeit der Bodenmikroorganismen, welche durch die Bodentemperatur unmittelbar reguliert wird, abhängen. Außerdem wird die Bodenatmung nicht allein durch die Bodenbakterien, sondern auch durch die Tätigkeit der mikroskopischen Pilze beeinflußt. Gerade der Umstand aber, daß zwischen der quantitativen Entwicklung der Bodenbakterien und den jeweiligen Bodenatmungswerten ein weitgehender Parallelismus besteht, zeigt, daß die Wirkung der Bodenbakterien die weitaus wichtigere Rolle spielen dürfte.

Tabelle III.

Der quantitative Zusammenhang zwischen den Änderungen des Bakteriengehalts und R_1-Werten.

$$y = -0{,}0039\,x^4 + 4{,}4\,x^3 - 1654{,}5\,x^2 + 267\,100\,x - 10\,120\,000.$$

x	y	y''	Δ
150	5 600 000	5 593 375	+ 6 625
200	6 100 000	6 080 000	+ 20 000
300	8 400 000	8 355 000	+ 45 000
400	14 000 000	13 760 000	+ 240 000
450	16 500 000	17 064 375	— 564 000

Der quantitative Zusammenhang zwischen den Änderungen der Bodenatmungs- und R_1-Werte.

x	y	y'	Δ
150	0,250	0,251	+ 0,001
200	0,380	0,382	+ 0,002
300	1,080	1,086	+ 0,006
400	1,950	1,953	+ 0,003
450	2,190	2,177	— 0,013

Um das Verhältnis zwischen Bodenbakterien und Bodenatmung auch quantitativ zu charakterisieren, haben wir auch diesen Zusammenhang mathematisch dargestellt, indem wir zu den jeweiligen Durchschnittswerten der Bodenatmung die zugehörigen Durchschnittszahlen des Bakteriengehalts in ein Koordinatensystem eintrugen. Zwischen den einzelnen Teilpunkten konnten wir dann ebenfalls mit großer Annäherung eine Gerade einlegen (siehe Abb. 6). Dieses Ergebnis beweist, daß innerhalb der auf unseren Versuchsflächen herrschenden Temperatur- und Feuchtigkeitsgrenzen die jeweilige Bodenatmung und die Anzahl der Bodenbakterien in geradem Verhältnis steht. Wie sich dieses Verhältnis bei höheren Temperaturen gestalten wird, werde ich später auf experimentellem Wege zeigen.

In der Literatur wurde in der letzten Zeit auch die Frage der Wurzelatmung aufgeworfen. Ich werde später experimentell zeigen können, daß diesem Faktor, im Verhältnis zu der überwiegenden Wirkung der Bodenbakterien und der Mikrobentätigkeit überhaupt, keine entscheidende Rolle zukommen kann. Da ferner die Tätigkeit und die Entwicklung der mikroskopischen Bodenpilze größtenteils mit der Entwicklung der Bodenbakterien parallel verläuft, so darf man auch ihre Rolle bei der Bodenatmung nicht unterschätzen. Zur quantitativen Trennung der Tätigkeit dieser Mikroorganismengruppe müssen aber vorerst noch geeignete experimentelle Untersuchungen durchgeführt werden.

Es wurde in der Literatur auch bemängelt (6), daß unsere Bodenatmungswerte, wahrscheinlich infolge unserer fehlerhaften Methodik, zu hoch ausgefallen seien. Als Ursache dafür wurde angegeben, daß wir bei der Bestimmung der Bodenatmungswerte nicht die kohlensäurereiche Luft der unteren Luftschichten, sondern den CO_2-Gehalt höherer Luftschichten zugrunde gelegt hätten. Bei Besprechung unserer Untersuchungsmethodik (1) habe ich bereits gezeigt, daß diese Annahme unrichtig war. Daß man bei den Bodenatmungsmessungen immer den CO_2-Gehalt der untersten Luftschichten in Betracht zieht, hielt ich für so selbstverständlich, daß ich es in den früheren Veröffentlichungen nicht erwähnt habe. Das Versäumte habe ich nun nachgeholt. Daß wir im Sommer gewöhnlich recht hohe Werte bekommen, hängt damit zusammen, daß wir immer auf gut durchlüfteten Böden arbeiten, die bei unserem warmen kontinentalen Klima, besonders im Sommer, eine außerordentlich lebhafte Tätigkeit entwickeln.

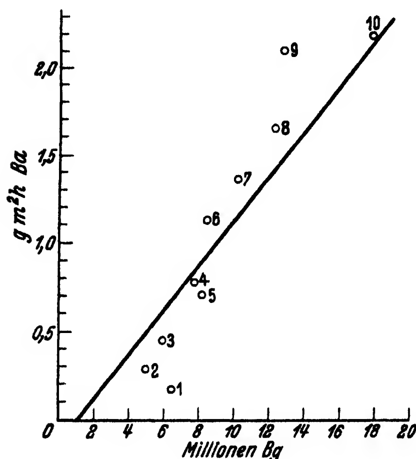


Abb. 6.

2. *Der quantitative Zusammenhang zwischen Bakteriengehalt, Bodenatmung und Humusgehalt.* Wenn man die bildliche Darstellung unserer Untersuchungen betrachtet, so wird man bemerken, daß in allen Jahren das Minimum des Humusgehalts regelmäßig mit dem Maximum des Bakteriengehalts zusammenfällt. Das dürfte selbstverständlich sein, da durch die Tätigkeit der Bodenbakterien und der mikroskopischen Bodenpilze schließlich die C-haltigen Humusstoffe verbraucht werden. Da auch die Bodenatmung ein Produkt dieses Vorganges ist, so ist ohne weiteres auch klar, daß mit der Erhöhung der Bodenatmung schließlich eine Abnahme des Humusgehalts eintreten muß. Innerhalb des gleichen Waldtyps wird daher auch mit der Zeit sich ein den örtlichen Verhältnissen angepaßtes Gleichgewicht in der Humuswirtschaft des Bodens einstellen.

Um die erwähnten Zusammenhänge nachzuweisen, haben wir zunächst die Versuchsflächen 11, 14 und 15 auf Grund von zweijährigen Untersuchungsergebnissen, ferner die Versuchsflächen 17, 20b und 24 bezüglich des Zusammenhanges zwischen Humusgehalt und Bakterienzahlen mathematisch bearbeitet. Wir haben auch diesmal zu den Bakterienzahlen die korrespondierenden Durchschnittswerte des Humusgehalts aufgesucht und sodann eine empirische Kurve eingelegt. Abb. 7 gibt hierbei näheren Aufschluß. *Man kann also feststellen, daß der Zusammenhang zwischen den Änderungen des Humusgehalts und den verschiedenen Werten der Bodenatmung durch eine Hyperbel ausgedrückt werden kann.*

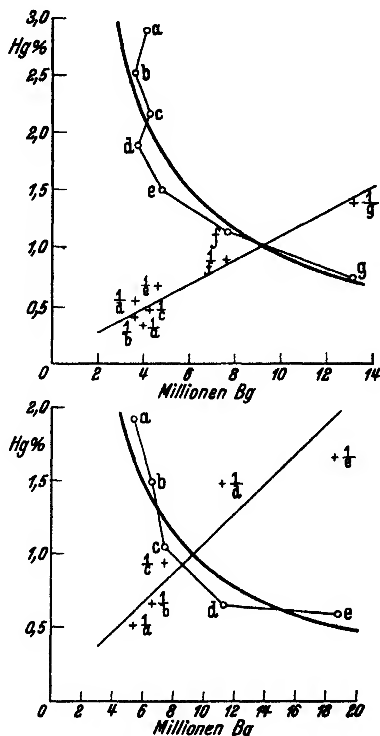


Abb. 7.
---- eingelegte Kurve,
— berechnete Kurve.

Der Zusammenhang zwischen dem Bakteriengehalt R_1 und zwischen der Bodenatmung auf Grund der Jahresdurchschnittswerte.

Ich bringe hierzu die Tabelle IV, deren vergleichende Betrachtung deutlich beweist, daß meine frühere Annahme über den unmittelbaren Zusammenhang zwischen dem Bakteriengehalt und den Werten R_1 vollkommen richtig war, und daß auch die durchschnittlichen Werte der Bodenatmung stets von der jeweiligen Größe des Bakteriengehalts, falls die Aeroben vorherrschen, abhängig sind.

Tabelle IV. Der Zusammenhang zwischen Bakteriengehalt, R_1 und Bodenatmung.

Versuchsfläche Nr.	Jahre	R_1	Bakterienzahl	Bodenatmung g/Std u. qm	R_1	Bakterienzahl	Bodenatmung g/Std. u. qm
		Jahresdurchschnittswerte			Maximum		
20 b	1932	282	8 550 000	1,226	395	14 350 000	1,911
	1933	244	6 440 000	0,771	352	14 200 000	1,638
17	1932	291	8 300 000	1,063	476	16 900 000	2,280
	1933	291	8 500 000	1,027	414	13 500 000	2,074
24	1932	259	9 200 000	0,858	490	18 800 000	2,081
	1933	259	9 120 000	0,738	371	13 200 000	1,683

Ich möchte noch zum Schluß folgendes erwähnen. Es wurde in der Literatur öfters die Frage erörtert, ob die jeweiligen Bakterienzahlen eines Bodens für seine biologische Tätigkeit charakteristisch sind. Bekanntlich hat besonders *Löhnis* (7) den Standpunkt vertreten, daß die Angabe der Bakterienzahlen eines Bodens bei der Beurteilung seiner sonstigen Tätigkeit und Güte in keiner Hinsicht maßgebend sei. Bei meinen Untersuchungen über den Stickstoffkreislauf des Waldbodens konnte ich schon zeigen, daß dieser Standpunkt von *Löhnis* nicht ganz richtig ist. Es wäre natürlich vollkommen unrichtig, auf Grund der rohen Bakterienzahlen über den biologischen Zustand eines Bodens ein endgültiges Urteil auszusprechen. Wird aber bei der mikrobiologischen Analyse eines Bodens das Zusammenwirken der die einzelnen Funktionen im Stoffkreislauf der Böden durchführenden Bakteriengruppen vergleichend betrachtet, so wird man schließlich doch eine gute Grundlage für die Beurteilung der Bodengüte bekommen. Bezüglich der Stickstoffbakterien des Waldbodens konnten wir die Richtigkeit dieser Annahme vollauf bestätigen. Auch bezüglich der Bodenatmung kann man die Anzahl der Bodenbakterien als einen guten Maßstab für die jeweilige Tätigkeit der Böden, namentlich der Waldböden, verwenden. Aber auch hier wird es notwendig sein, immer neben der Gesamtzahl der Mikroorganismen auch das in dieser Hinsicht wichtige Verhältnis der aeroben Bakterien zu den anaeroben eingehend zu betrachten. Für die Bestätigung des Gesagten habe ich in meinen früheren Arbeiten charakteristische Beispiele aufgeführt (1). Ich muß aber darauf hinweisen, daß die vorliegenden Forschungsergebnisse meine Meinung ebenfalls vollauf bestätigen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Zwischen der quantitativen Entwicklung der Bodenbakterien und der Änderungen der Bodenatmung besteht ein fast vollständiger Parallelismus. Die Maximal- und Minimalwerte dieser Biofaktoren fallen stets zusammen. Die höchsten Bakterienzahlen und die größte Intensität der Bodenatmung wird stets in den Sommermonaten erreicht, worauf in den kalten Wintermonaten eine starke Depression folgt.

2. Da die Änderungen des Bakteriengehalts des Waldbodens durch das korrelative Zusammenwirken von Bodentemperatur und Bodenfeuchtigkeit beeinflußt werden, so werden diese beiden Biofaktoren unmittelbar auch die Gestaltung der Bodenatmung beeinflussen. Die Bodentemperatur wirkt auch direkt, weil sie, unabhängig von der Zahl, auch die Intensität der Mikrobentätigkeit beeinflussen kann.

3. Der zeitliche Verlauf der Bodenatmung kann, ähnlich wie der zeitliche Verlauf des Bakterienlebens, annähernd durch die Formel von *Robertson* charakterisiert werden.

4. Den Zusammenhang zwischen Bodenatmung und Bakterienzahlen einerseits und den Änderungen der *R*-Werte andererseits kann man mit einer Parabel vierter Ordnung ausdrücken. Die Bodenatmung steht dagegen zu den jeweiligen Bakterienzahlen in einem

geraden Verhältnis. Diese Feststellung gilt aber nur bei einer Bodentemperatur nicht über 25° C.

5. Das Maximum des Bakteriengehalts und die Intensität der Bodenatmung führt stets eine Depression des Humusgehalts herbei. Diesen Zusammenhang kann man mit einer Hyperbel charakterisieren. Bezüglich der anderen Einzelheiten wird auf die Ausführungen in dieser Arbeit verwiesen.

6. Alle Gesetzmäßigkeiten und inneren Zusammenhänge, welche den dynamischen Verlauf des Bakterienlebens des Waldbodens beeinflussen, haben auch für die Freilandböden volle Gültigkeit, deren biologische Tätigkeit von künstlichen Eingriffen der Menschen nicht gestört wird. Die schützende und die ausgleichende Wirkung des Waldbestandes wird auf diesen Böden durch die Pflanzendecke übernommen.

Literatur.

1) *D. Fehér*, Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin 1933. — 2) *Derselbe*, diese Zeitschr. 8, 609, 1932. — 3) *Derselbe*, Silva 20, 141, 1932. — 4) *Schubert*, zitiert nach *Vági-Fehér*, Bodenkunde, Sopron 1931, S. 490. — 5) *D. Fehér*, diese Zeitschr. 4, 447, 1933. — 6) *L. G. Romell*, Soil Science 34, 3, 161, 1932. — 7) *F. Löhnis*, Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie, 2. Aufl., Bornträger. Berlin 1926, S. 337.

[Aus dem Botanischen Institut der kgl. ung. Hochschule für Berg- und Forstingenieure, Sopron (Ungarn).]

Die Verwendung der elektrometrischen p_H-Messung bei der Ermittlung der Keimzahl der Böden.

II. Mitteilung: Vergleichende Übersicht über die gewonnenen Untersuchungsergebnisse.

Von

D. Fehér.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. April 1934.)

Ich habe schon an anderer Stelle (1) betont, daß ich später über die Anwendungsmöglichkeiten der Methode berichten würde. Wir haben inzwischen das Verfahren nicht nur bei vielen Einzeluntersuchungen von Böden verschiedenster Herkunft, sondern seit dem 1. Januar 1933 auch bei den jahreszeitlichen Untersuchungen unserer ständigen Versuchsflächen benutzt und, um das Wesen und die Ergebnisse dieser Methodik mit denen der gewöhnlichen Plattenmethode vergleichen zu können, folgende Versuchsflächen parallel nach beiden Methoden periodisch untersucht:

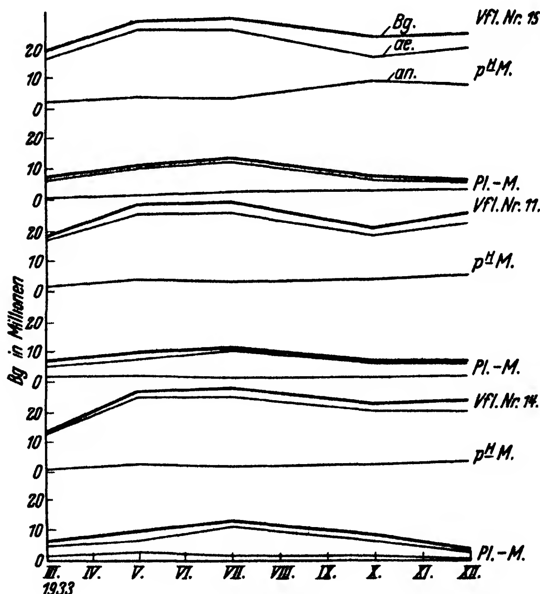


Abb. 1.
Vfl. = Versuchsfläche, *Pl.-M.* = Plattenmethode, p_H*-M.* = p_H-Methode.

Versuchsfläche 15: Fichtenwald von mittlerem Alter in der Umgebung von Sopron; Versuchsfläche 11: Buchenwald von mittlerem Alter ebenda; Versuchsfläche 24: Kontrollfläche im botanischen Garten der Hochschule in Sopron; Versuchsfläche 31: Buchenwald in Eberswalde; Versuchsfläche 55: Laubholzmischwald in Tharandt.

Die Technik der neuen Untersuchungsmethode habe ich im ersten Teil dieser Arbeit (1) schon ausführlich dargestellt. Um möglichst exakt zu arbeiten, haben wir die kritische Verdünnungsgrenze auch stets mit Agar- und Gelatineplatten kontrolliert, wie ich das am gleichen Orte beschrieben habe. Bei den aeroben und anaeroben Kulturen wurden immer parallele Serien bestimmt, und im Falle der Abweichung wurde dann das arithmetische Mittel gebildet. Die Gesamtzahl der Bakterien wurde durch Addition der aeroben und anaeroben Bakterien ermittelt. Natürlich ist für diese Untersuchungsmethodik die gute und verläßliche Entnahme der Durchschnittsproben, wie ich es bereits angegeben habe, von ausschlaggebender Wichtigkeit.

Diese vergleichenden Untersuchungen waren schon dazu nötig, um das quantitative Verhältnis zwischen den Ergebnissen der beiden Verfahren zu bestimmen. Mit Hilfe der erhaltenen Werte können wir dann weiterhin, dort wo es notwendig sein sollte, die Forschungsergebnisse der neueren Methode mit denen des älteren Verfahrens vergleichen.

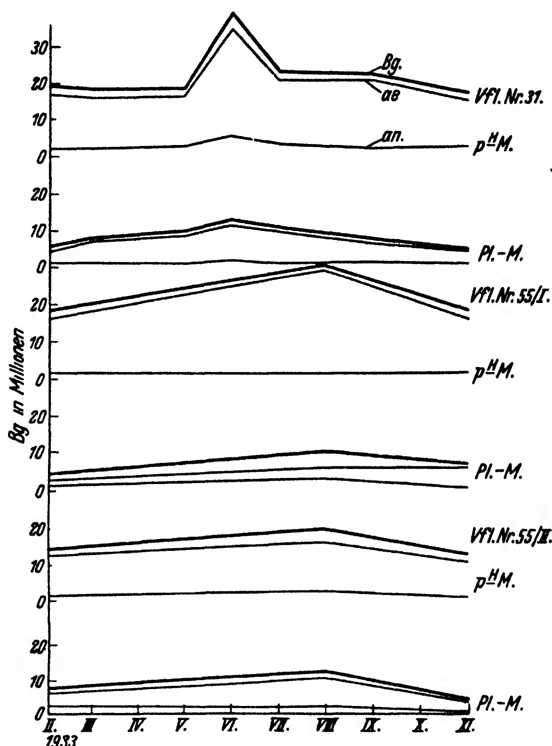


Abb. 2.
Vfl = Versuchsfläche, p_H-M. = p_H-Methode, Pl-M. = Plattenmethode.

Die Abb. 1 und 2, die die Untersuchungsergebnisse wiedergeben, und die Tabelle 1, die die Verhältniszahlen bringt, zeigen, daß, abgesehen von der jahreszeitlichen Periodizität des Bakterienlebens, die auch mit der neuen Methode vollkommen einwandfrei nachgewiesen wurde, die Bakterienzahlen, die mit der Plattenmethode gewonnen wurden, immer um ein Vielfaches niedriger waren als die mit der neuen Methode gewonnenen. Das bestätigt vollkommen meine frühere Annahme, wonach der Nährboden des neuen Kulturverfahrens, der Boden selbst in seiner natürlichen Zusammensetzung, für die Ermittlung des Keimgehalts der Böden bedeutend günstiger ist als die künstlichen Nährböden. Man sieht aber auch gleichzeitig, daß die gewissenhafte elektro-

Tabelle I.

Versuchsfläche		Verhältniszahl			
Nr.	Ort	Frühjahr	Sommer	Herbst	Winter
15	Sopron	2,58; 2,71	2,26	3,95	5,79
11	„	2,70; 3,01	2,58	3,47	4,34
24	„	2,14; 2,74	2,05	2,56	5,82
	Durchschnitt:	2,65	2,30	3,33	5,32
31	Eberswalde	2,56; 2,06	2,19; 3,12	2,75	4,04; 2,50
	Durchschnitt:	2,31	2,66	2,75	3,27
55/I.	Tharandt	4,76	3,26	2,59	—
55/II.	„	2,17	1,72	4,68	—

metrische p_H-Messung ein ausgezeichnetes Mittel zur Ermittlung der Keimzahl der Böden darstellt, in Bestätigung meiner früheren Ergebnisse (3). Um die Verwendbarkeit dieser Methode auch für andere Böden zu zeigen, bringe ich in Tabelle II einige charakteristische Beispiele, ebenfalls Ergebnisse von parallelen Untersuchungen.

Tabelle II.

Versuchsfläche			Gesamtbakterienzahl aerob + anaerob		Verhältniszahl	Aktivitätsgrad	Beobachtungszeit
Nr.	Ort	Breitengrade	Plattenmethode	p_H-Methode			
69	Sahara . . .	32°	8 940 000	21 670 000	2,42	20	IV. 1933
33	„ . .	32	8 605 000	23 300 000	2,70	20	V. 1933
84	Sicilien . . .	—	11 100 000	25 000 000	2,23	25	V. 1933
76	Italien . . .	43° 46′	5 640 000	21 670 000	3,84	20	III. 1933
85	Nancy . . .		8 350 000	21 670 000	2,69	20	V. 1933
5	Szeged . . .	46 15	10 300 000	25 000 000	2,42	20	V. 1933
38	Rajvola . .	60 17	6 000 000	20 000 000	3,34	20	V. 1933
40	Kivalo . . .	66 50	6 280 000	16 300 000	2,58	14,3	V. 1933
44	Petsamo .	69 20	5 720 000	19 200 000	3,35	16,7	V. 1933

Übrigens hat sich natürlich infolge der langen Transportdauer die biologische Beschaffenheit der Böden, die von weit entfernten Versuchsflachen stammen, gewöhnlich wesentlich verändert. Die ermittelten Untersuchungsergebnisse beziehen sich daher nicht auf den Zustand, in dem sich der Boden bei der Probeentnahme befunden hat, sondern stellen die biologische Aktivität der Böden zur Zeit der Untersuchung dar. Daß auch hier eine gewisse Periodizität zu konstatieren ist, zeigen unsere Forschungen.

Zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden besteht jedenfalls eine quantitative Beziehung. Im allgemeinen sind die Bakterienzahlen, die mit der neuen Methode gewonnen wurden, durchschnittlich größer als die mit der alten Methode gewonnenen. Das gilt wenigstens für die Gesamtzahl der Bakterien. Für die anaeroben Bakterien dürfte es ganz anders sein, was noch näher aufgeklärt werden muß.

Die Untersuchungen über die Anwendung der neuen Methode auf die Bestimmung der physiologischen Bakteriengruppen (nitrifizierende, denitrifizierende, den freien Stickstoff der Luft bindende Bakterien) sind noch nicht völlig abgeschlossen. Es wird später darüber berichtet werden.

Die Einführung eines neuen Ausdrucks zur Charakterisierung der biologischen Tätigkeit der Böden an Stelle der bisher angegebenen Bakterienzahlen.

Im Laufe der langjährigen Untersuchungen meines Instituts habe ich mir öfter die Frage vorgelegt, ob es nicht möglich wäre, statt der bisher üblichen Bakterienzahlen einen besseren, viel genaueren Ausdruck zur Charakteristik des Bodenlebens zu setzen. Die Anwendung der Bakterienzahlen ist in der Literatur sehr oft kritisch besprochen. Die Meinungen waren insoweit einig, als man mit Rücksicht auf die Unzulänglichkeit der älteren Untersuchungsmethoden den Bakterienzahlen keine besondere Bedeutung beigemessen hat. Die direkte mikroskopische Zählung ist ja, wie ich bereits früher (2) ausgeführt habe, fast vollkommen ungeeignet zur Charakterisierung des Bodenlebens, schon weil fast immer auch die toten Keime mitgezählt werden. Aber auch die übrigen direkten Methoden [*Cholodny* (2) usw.] sind unzulänglich und trotz mancher Vorteile recht unvollkommen. Die Platten- und die elektive Methode haben sich, wenn man dabei auch die Differentialuntersuchung der verschiedenen physiologischen Bakteriengruppen durchführt, als ziemlich brauchbar erwiesen, wie auch die Ergebnisse der Untersuchungen unseres Instituts bewiesen haben, leiden aber unter dem großen Nachteil, daß sie mit künstlichen Nährböden arbeiten. Man darf annehmen, daß eine beträchtliche Anzahl von Bodenbakterien auf diesen Nährböden überhaupt nicht zum Vorschein kommt, weil sie von anderen Arten, welche sich den Verhältnissen und Bedingungen dieser Nährböden mehr anpassen, meistens überwuchert und unterdrückt werden. Auch in der Abschätzung und Beurteilung der Bakterienzahlen können Fehler vorkommen, zumal sie eine meist erst durch längere Untersuchungen erreichbare Erfahrung voraussetzen. Trotzdem kann man mit dieser Methode verhältnismäßig gute und wenigstens *in relativer Hinsicht brauchbare* Ergebnisse erreichen.

Durch die Einführung des Bodens als Nährmedium ist es mir gelungen, zunächst die Nachteile der künstlichen Nährböden auszuschalten oder doch auf ein Mindestmaß zu reduzieren und später die biologische Aktivität der Bodenmikroorganismen durch die Anwendung von physiko-chemischen Messungen quantitativ zu erfassen. Daß auch dieses Verfahren keinen Anspruch auf absolute Vollkommenheit erheben kann, ist mir vollkommen klar. Seine Vorteile bestehen eben darin, daß durch seine Anwendung doch eine gewisse Annäherung an die natürlichen Verhältnisse erreicht wird.

Aber auch die Ergebnisse dieser neuen Methode habe ich im Anfang in Bakterienzahlen ausgedrückt, die nach meiner eben dargelegten Auffassung keine befriedigende Lösung darstellen. Deshalb habe ich mich entschlossen, für die Charakterisierung des biologischen Zustandes des Bodens einen anderen, mehr kumulativen Ausdruck einzuführen. Bei der Besprechung der Untersuchungsergebnisse meines Instituts habe ich (2) immer und wieder betont, daß der Boden als eine lebende Materie aufzufassen ist, die ununterbrochen biologisch und biochemisch arbeitet und quantitative Veränderungen erleidet, welche durch die physiko-chemischen Untersuchungsmethoden gut erfaßt werden können.

Davon ausgehend habe ich den Entschluß gefaßt, den biologischen Aktivitätsgrad eines Bodens statt durch die bisher angewendeten Bakterienzahlen einfach durch jenen höchsten Verdünnungsgrad quantitativ auszudrücken, der noch imstande ist, in einem sterilen Boden meßbare physiko-chemische Veränderungen infolge der biologischen Tätigkeit der Bodenmikroorganismen hervorzurufen. Ich werde künftig diesen Verdünnungsgrad als den *biologischen Aktivitatsgrad der Boden* bezeichnen.

Ich bringe in der Tabelle III diese Verdünnungsgrade, die wir bei unseren Untersuchungen gewöhnlich gebrauchen. Die biologische Aktivität des Bodens wird also einfach durch die „Aktivitätszahl" ausgedrückt, d. h. durch Zahlen, die, mit einer Million multipliziert, die einzelnen Verdünnungen ergeben. Dies habe ich auch fur die Charakterisierung der Tätigkeit der physiologischen Bakteriengruppen eingeführt. Um die qualitative Verteilung der Bakterienflora auf Grund des Aktivitätsgrades entsprechend zu charakterisieren, kann man die einzelnen Arten bei den verschiedenen Verdunnungsgraden qualitativ und quantitativ in Prozenten bestimmen, so daß man den Anteil, den die einzelnen Arten bei dem Hervorrufen des betreffenden Aktivitätsgrades einnehmen, ohne die Angabe der bisher üblichen und recht unzulänglichen Bakterienzahlen ausdrücken kann.

Tabelle III.

Aktivitäts-grad	Verdünnungs-grad	Aktivitäts-grad	Verdünnungs-grad	Aktivitäts-grad	Verdünnungs-grad
0,0001	1 : 100	1,00	1 : 1 000 000	11,1	1 : 11 100 000
0,001	1 : 1 000	1,11	1 : 1 110 000	12,5	1 : 12 500 000
0,005	1 : 5 000	1,25	1 : 1 250 000	14,3	1 : 14 300 000
0,01	1 : 10 000	1,43	1 : 1 430 000	16,7	1 : 16 700 000
0,025	1 : 25 000	1,67	1 : 1 670 000	20,0	1 : 20 000 000
0,05	1 : 50 000	2,0	1 : 2 000 000	25,0	1 : 25 000 000
0,067	1 : 67 000	2,5	1 : 2 500 000	33,0	1 : 33 000 000
0,1	1 : 100 000	3,3	1 : 3 300 000	50,0	1 : 50 000 000
0,25	1 : 250 000	5,0	1 : 5 000 000	67,0	1 : 67 000 000
0,50	1 : 500 000	6,7	1 : 6 700 000	100,0	1 : 100 000 000
0,67	1 : 670 000	10,0	1 : 10 000 000		

Ich möchte noch darauf hinweisen, daß durch dieses Verfahren und durch jenen Ausdruck auch jede fermentative und gegebenenfalls hormonale Wirkung gut charakterisiert werden kann, welche durch die Tätigkeit der Bodenmikroorganismen hervorgerufen wird. Gerade diese Wirkungen konnte man früher durch die Angabe der Bakterienzahlen nicht einmal annähernd charakterisieren. Durch den neuen Ausdruck und durch sein Wesen wird für unsere künftigen Forschungen nun auch dieser Weg frei gemacht.

Anhang.

Der Zusammenhang zwischen den biologischen Änderungen der p_H-Werte und den biologischen Veränderungen der Leitfähigkeit der Böden.

In einer früheren Arbeit (4) habe ich nachgewiesen, daß auch bei der Veränderung der Leitfähigkeit der Böden Mikroorganismen bzw. die von ihnen bewirkten Umsetzungen fast die entscheidende Rolle spielen. In einer anderen Arbeit (3) konnte ich dann zeigen, daß die Leitfähigkeitswerte durch die Stillegung des Bodenlebens vollständig fixiert werden. Diese Ergebnisse führten zu dem Versuch, die Verwendung der Leitfähigkeitsmessungen zur Bestimmung des biologischen Aktivitätsgrades der Böden zu benutzen. Ich bringe hierfür in der Abb. 3 einige charakteristische Beispiele, die die Möglichkeit zeigen, neben der p_H-Messung auch die Leitfähigkeitsmessung zur Bestimmung des biologischen Aktivitätsgrades zu benutzen. Diese Feststellung hat aber meiner Ansicht nach nur theoretischen Wert, da die elektrometrische p_H-Messung viel leichter und auch viel empfindlicher ist, wenn es sich darum handelt, die Aktivitätszahl zu ermitteln.

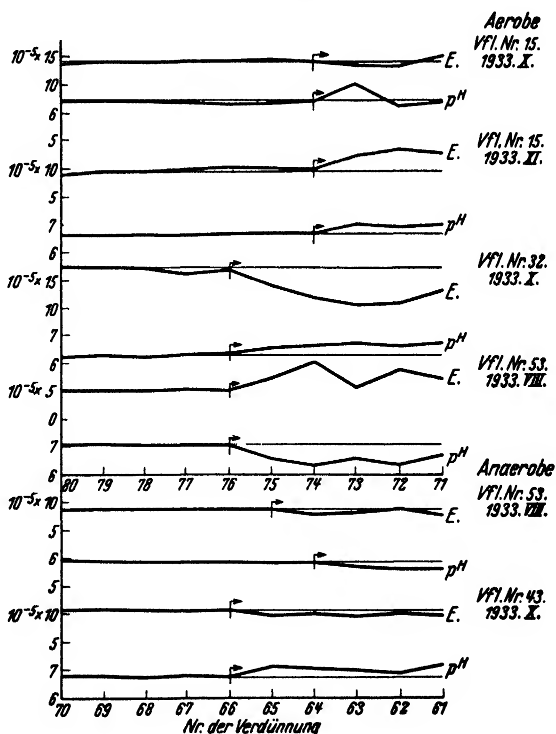


Abb. 3.
Vfl. = Versuchsfläche.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Es wird die Geeignetheit der elektrometrischen p_H-Messung bei der Ermittlung der Keimzahl der Böden auf Grund ausgedehnter Untersuchungen bewiesen.

2. Es wird ferner gezeigt, daß neben der elektrometrischen p_H-Messung auch die Leitfähigkeitsmessung zur Bestimmung der Keimzahl verwendet werden kann.

3. Um die Unzulänglichkeiten der bisher zur mikrobiologischen Charakterisierung des Bodens verwendeten Bakterienzahlen zu vermeiden, wird ein neuer quantitativer Ausdruck fur die Charakteristik der biologischen Tätigkeit der Böden vorgeschlagen. An Stelle der bisher verwendeten Bakterienzahlen wird der Begriff des Aktivitätsgrades des Bodens eingeführt. Unter dem Aktivitätsgrad wird jene höchste Verdünnung eines Bodens verstanden, welche, in sterilen Boden übergeimpft, dort noch mit physiko-chemischen Methoden meßbare, durch die Tätigkeit der Bodenmikroorganismen hervorgerufene Veranderungen hervorruft.

Literatur.

1) *Fehér*, diese Zeitschr. 4, 257—270, 1933. — 2) *Derselbe*, Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin, Springer, 1933. — 3) *Derselbe*, diese Zeitschr. 5, 402, 1934. — 4) *Derselbe*, Arch. f. Pflanzenbau 9, 172—196, 1932.

(Aus dem Botanischen und dem Kältetechnischen Institut
der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Untersuchungen über den Einfluß der Luftbewegung auf das Wachstum von Schimmelpilzen auf gekühltem Fleisch[1].

Von

G. Kaeß und W. Schwartz.

Mit 4 Textabbildungen.

(Eingegangen am 25. April 1934.)

I. Einleitung. Im praktischen Kühlbetrieb ist die Wasserzufuhr aus dem Substrat der einzige für die Entwicklung von Schimmelpilzen und Bakterien wichtige Faktor, der sich während der Lagerzeit allmählich ändert. Soll das Wachstum gehemmt werden, so müssen an der Oberfläche des Kühlgutes, auf der sich Pilze entwickeln, Quellungsdruck und osmotischer Druck durch Wasserentzug bis zu einem bestimmten, für die einzelnen Pilzarten charakteristischen Grenzwert erhöht werden.

Die Änderung des Oberflächenzustandes von Kühlfleisch erfolgt dadurch, daß die Luft des Kühlraumes dem Fleisch Feuchtigkeit entzieht. Ist die in der Zeiteinheit an die Luft abgegebene Wassermenge größer, als die durch Diffusion und Kapillarwirkung aus dem Innern nachgelieferte, so bildet sich auf dem Fleisch eine Haut, auf der vermutlich das Pilzwachstum gehemmt wird. Die Verdunstung vollzieht sich nach der Gleichung (vgl. *Merkel* 1925)

$$W = \sigma F\,(x_F - x_L),$$

wobei W = stündlich durch Verdunstung entzogene Wassermenge (kg/h), σ = Verdunstungszahl in kg Wasser je m² Oberfläche und Stunde, F = Oberfläche des Fleisches (m²), x_F = Wassergehalt der Luft unmittelbar über der Fleischoberfläche in kg Wasser pro kg trockene Luft, x_L = Wassergehalt der Kühlraumluft (kg/kg).

Der Oberflächenzustand des Fleisches ändert sich um so mehr, je niedriger x_L ist, und je rascher der Wasserentzug erfolgt. Dabei sinkt x_F und wird schließlich in dem praktisch allerdings nicht erreichten Grenzfall gleich x_L. Der Verminderung von x_L sind jedoch Grenzen gesetzt mit Rücksicht auf die Gewichtsverluste und die mit einer zu starken Abtrocknung der Oberfläche verbundene Wertminderung des Fleisches.

Bei Untersuchung der Verhältnisse in ruhender Luft (*Schwartz* und *Kaeß* 1934) hat sich herausgestellt, daß die im Kühlraum verwendbaren Luftfeuchtigkeiten selbst bei Senkung der Temperatur auf 0° C für eine die Verlängerung der Lagerdauer ermöglichende Hemmung der Schimmel-

[1] Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung des Ingenieurdienstes ausgeführt. Die Apparatur konnte aus Mitteln der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft beschafft werden.

pilze noch zu hoch sind. Es bleibt zu prüfen, wie weit etwa durch eine Luftbewegung im Kühlraum, d. h. durch eine Vergrößerung von σ, das Pilzwachstum verzögert werden kann.

Für die Verdunstungszahl kann man $\sigma = \alpha/c_p$ setzen (vgl. *Lewis* 1922, *Merkel* 1925), wobei α die Wärmeübergangszahl in k cal/m², h, °C und c_p die spezifische Wärme des Wasserdampf-Luft-Gemisches in k cal/kg, ° C ist. Von den beiden Größen α und c_p ist α von der Luftbewegung abhängig und wächst sehr wahrscheinlich schon bei kleinen Geschwindigkeiten verhältnismäßig rasch. Der Wert σ nimmt proportional mit α zu, und man kann erwarten, daß Keimung und Wachstum der Schimmelpilze infolge der Änderung des Oberflächenzustandes gehemmt werden. Auch hier muß zur Bedingung gemacht werden, daß die Luftumwalzung nur innerhalb der Grenzen erfolgen darf, in denen die Gewichtsverluste erträglich bleiben.

Wir haben an zwei auf Fleisch vorkommenden Schimmelpilzen (*Penicillium flavo-glaucum* und *Mucor racemosus*) den Einfluß der in Kühlräumen üblichen Luftgeschwindigkeiten auf das Wachstum des Mycels und auf die Bildung von Sporen und Konidien untersucht.

II. Versuchsanordnung. Die relative Feuchtigkeit betrug $\varphi = 90\%$, die Temperatur $t = 6^0$, in einem Falle $t = 3^0$ mit einer Schwankung von $\pm 0{,}1^0$ C. Die Luft strömte mit 0, 5, 12 cm/sec an den Versuchsstücken vorbei.

Die Versuchsapparatur war in einen Elektrolux-Kühlschrank eingebaut. Ein Kontaktthermometer steuerte über ein *Cutax*-Relais den Strom einer Heizung, welche die überschüssige Kalte der dauernd eingeschalteten Absorptionsmaschine kompensierte. Ein Ventilator sorgte für eine gleichmäßige Temperaturverteilung im Schrankraum (Abb. 1).

In der allseitig luftdicht abgeschlossenen Versuchsapparatur waren die in dem Versuchsraum aufgehängten Fleischstücke dem vom Gebläse erzeugten Luftstrom ausgesetzt. Zur Regulierung des Luftumlaufs diente ein Drosselhahn. Die umlaufende Luftmenge wurde mit einem Rotamesser[1] ermittelt; aus ihr konnte die Luftgeschwindigkeit berechnet werden. Der Feuchtigkeitsgehalt ließ sich dadurch konstant halten, daß die Luft ein in den Kreislauf eingeschaltetes Solebad mit einer Kochsalzlösung von bestimmter Konzentration passieren mußte.

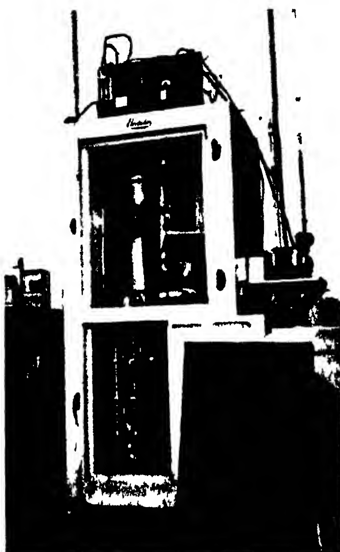
Als Versuchsstücke benutzten wir die gleichen zylindrischen Fleischkörper von 30 mm Durchmesser und etwa 7 mm Hohe und einem Verhaltnis von Oberfläche zu Gewicht von etwa 0,4 m²/kg, die auch bei unseren Versuchen in ruhender Luft Verwendung gefunden hatten. Wegen der Einzelheiten bei der Vorbereitung der Impfung der Fleischstücke sowie bei der Messung des Flächenwachstums und der Zählung der Fortpflanzungszellen verweisen wir auf unsere frühere Mitteilung (*Schwartz* und *Kaeß* 1934). In den meisten Fällen waren die Fleischstücke so aufgehangt, daß die Luft parallel zum Infektionsstreifen vorbeiströmte, nur in einem Versuch traf die Luftströmung senkrecht zu dem sich entwickelnden Pilz auf das Fleischstück.

Die verwendete Kochsalzlösung hatte ein spezifisches Gewicht von 1,103. Die durch die Sole geleitete Luft kann dann die relative Feuchtig-

[1] Hergestellt von den Rotawerken in Aachen.

keit von 90 % erreichen (*Linge* 1929). Die Einstellung der Feuchtigkeit wurde mit dem *Aßmann*schen Thermometer nachgeprüft. Bei 6° C und 12 cm/sec Luftgeschwindigkeit war die psychrometrische Differenz 0,6° C. Da nach *Carrier* und *Lindsay* (1925) bei diesen Bedingungen die theoretische Differenz zwischen trockenem und feuchtem Thermometer (0,7° C) um etwa 15 % zu niedrig ist, scheint die geforderte relative Luftfeuchtigkeit von 90 % mit genügender Genauigkeit erreicht zu sein.

Strömt die Luft an den Fleischstücken vorbei, so nimmt sie bei dem angegebenen Luftzustand im Mittel 0,014 g Wasser



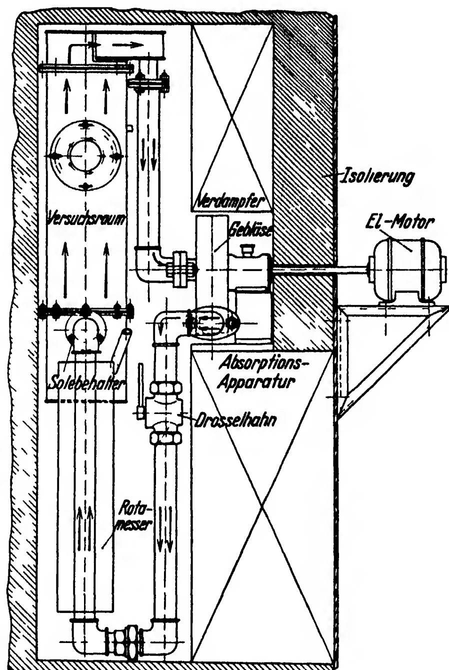


Abb. 1a und b.
Versuchsapparatur, bestehend aus der Versuchskammer, dem Gebläse nebst Antrieb, dem Drosselhahn zur Regulierung, dem Rotamesser zur Feststellung der Luftmenge und dem Solebehälter.

je kg Luft auf. Die dadurch bedingte Erhöhung der relativen Feuchtigkeit kann bei Annahme gleichmäßiger Verteilung der aufgenommenen Feuchtigkeit über den durchströmten Querschnitt aus dem i/x-Diagramm nach *Mollier* (1923) zu rund 0,1 % bestimmt werden, eine Änderung, die unbeachtet bleiben kann. Auch die durch Wasseraufnahme aus der Luft bedingte Zunahme der relativen Feuchtigkeit über der Sole kann vernachlässigt werden. Sie läßt sich nach einer Versuchszeit von 12 Tagen zu etwa 0,4 % berechnen. Eine Kontrolle durch Bestimmung des spezifischen Gewichtes der Sole und Ermittlung der zugehörigen Feuchtigkeit ergab den gleichen geringen Wert.

Im Luftumlauf entstehen dadurch, daß die Luft das Solebad passiert, kleine Schwankungen. Sie bewirken, daß die Luftmenge am Rotamesser nur mit $\pm$ 0,2 m³/h abgelesen werden kann. Die hierdurch verursachte

Schwankung der Geschwindigkeit im Versuchsgefäß beträgt bei 5 cm/sec ± 2,5 % und bei 12 cm/sec etwa ± 6 % der angegebenen mittleren Geschwindigkeit.

Der Rotamesser wurde von den Rotawerken bei 0° C geeicht. Die angezeigte Menge ist umgekehrt proportional der Wurzel aus dem spezifischen Gewicht der Luft (*Gramberg* 1933), so daß sich bei Messungen bei + 6° C eine Fehlanzeige ergibt, die innerhalb des Ablesefehlers liegt.

III. Versuchsergebnisse. Eine Verzögerung des Wachstums unter dem Einfluß bewegter Luft läßt sich tatsächlich nachweisen (Abb. 2). Vergleichen wir den Wachstumsverlauf bei bewegter und ruhender Luft, so ist ersichtlich, daß *Penicillium* und *Mucor* bei den Luftgeschwindigkeiten von 5 und 12 cm/sec mit geringer Verzögerung gegenüber der Kontrolle fast gleichzeitig mit der Bildung von Luftmycel beginnen. Trifft der Luftstrom senkrecht auf die geimpfte Flache (Versuch mit *Mucor racemosus*), so ist die Verzögerung des Wachstums stärker als bei Führung parallel zur Impffläche, was damit zusammenhängt, daß in diesem Fall die Wärmeubergangszahl und somit auch die Verdunstungszahl größer ist.

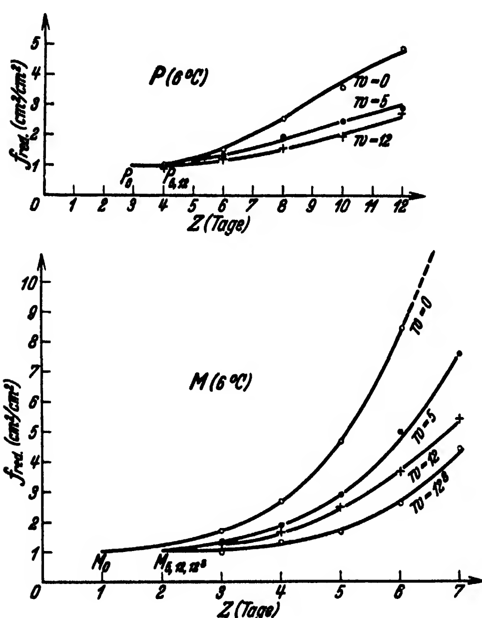


Abb. 2 a und b.
Verlauf des Wachstums bei bewegter Luft. $t = 6^0$ C, $\varphi = 90$ %. P = *Penicillium flavo-glaucum*, M = *Mucor racemosus*. Luftgeschwindigkeit w = 5cm/sec und w = 12 cm/sec. Kontrolle (w = 0 cm/sec) bei ruhender Luft. Die Fleischstücke sind so aufgehängt, daß die Luft parallel der Impffläche vorbeistreicht, außer bei w = 12 sec, wo der Luftstrom senkrecht auf die geimpfte Fläche trifft.

Mit zunehmender Lagerzeit vergrößert sich der Einfluß der Luftgeschwindigkeit, da die Feuchtigkeit über der Fleischoberfläche immer mehr dem Feuchtigkeitswert der Luft angenähert wird. Bei *Penicillium flavo-glaucum* sind die Unterschiede in der Verzögerung des Wachstums bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten der Luft nicht groß (Abb. 3a). Das erklärt sich daraus, daß *Penicillium* bei einer Feuchtigkeit von 90 % an der Fleischoberfläche immer noch günstige Wachstumsbedingungen vorfindet, vielleicht auch daraus, daß der Feuchtigkeitsausgleich zwischen Fleischoberfläche und Luft bei Versuchsstücken mit

einem Verhältnis von Oberfläche zu Gewicht von 0,4 durch die angewandten Luftgeschwindigkeiten nicht mehr wesentlich beschleunigt werden kann.

Bei *Mucor racemosus* (Abb. 3b) ist der Einfluß der Luftbewegung etwas größer, was damit übereinstimmt, daß sich in früheren Versuchen (*Schwartz* und *Kaeß* 1934) *Mucor* auch in ruhender Luft als empfindlich gegenüber einer Feuchtigkeitssenkung auf 90 % erwiesen hat.

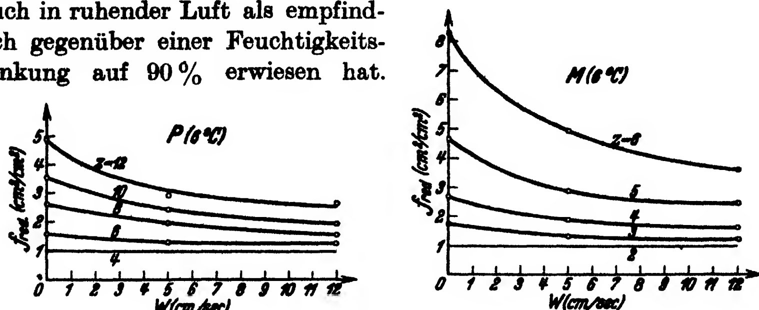


Abb. 3a und b.
Einfluß verschiedener Strömungsgeschwindigkeiten der Luft auf das Flächenwachstum nach verschiedenen Lagerzeiten (z in Tagen) $t = 6^0$ C, $\varphi = 90\,^0/_0$ M = *Mucor racemosus* P = *Penicillium flavo-glaucum*

Schließlich sollte der hemmende Einfluß der Luftbewegung im Verein mit einer Temperaturerniedrigung geprüft werden (Abb. 4). Es zeigte sich aber auch in diesem Fall, in einer Versuchsreihe mit *Mucor racemosus* bei $t = +3^0$ C, daß die Entwicklung sich nur in geringem, für die praktische Kaltlagerung unwesentlichem Maße verlangsamen laßt.

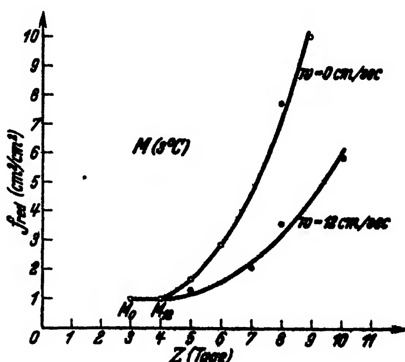


Abb. 4.
Wachstumsverlauf bei *Mucor racemosus* bei $t = +3^0$ C und $w = 12$ cm/sec, verglichen mit dem Wachstum bei ruhender Luft ($w = 0$).

Weitere Erhöhung der relativen Feuchtigkeit bei Anwendung starker Luftbewegung könnte dazu führen, daß es bei geringen Temperaturschwankungen zur Wasserdampfkondensation am Lagergut kommt. Eine merkliche Hemmung der Schimmelpilze ist kaum zu erwarten, da sich bei höheren Feuchtigkeiten Quellungsverhältnisse und osmotische Verhältnisse an der Fleischoberfläche noch weniger ändern können. Stärkere Wachstumshemmungen wären offenbar nur möglich bei Anwendung sehr tiefer

relativer Luftfeuchtigkeiten und hoher Luftgeschwindigkeiten, die zu bedeutenden Gewichtsverlusten und zur Verschlechterung des Aussehens und der Qualität führen würden. Die Untersuchungen wurden mit magerem Fleisch ausgeführt, das dem Verderb am stärksten ausgesetzt ist. Für Fleisch, das mit Fett und Bindegeweben überzogen ist, geben *Haines* und *Smith* (1932) bei Bakterieninfektion eine Verlängerung der Lagerdauer durch Luftbewegung auf etwa das $2^1/_2$fache an.

Die Konidien- und Sporenbildung (Tabelle 1) wird bei Anwendung von bewegter Luft ebenfalls beeinflußt. Von wenigen Ausnahmen ab-

Tabelle I.

Zahl der Fortpflanzungszellen in ruhender und bewegter Luft.

Untersuchter Pilz	Lagertemperatur °C	Zeit Tage	Luftgeschwindigkeit in cm/sec 0	5	12
Penicillium flavo-glaucum	+ 6	10	26,1 . 10^6	38,2 . 10^6	3,15 . 10^6
		12	63,6	67,6	6,88
		14	99,2	86,5	26,9
Mucor racemosus . . .	+ 6	6	19,2	1,24	2,11
		7	27,9	6,45	4,29
		8	60,8	19,5	8,23
	+ 3	8	1,7	—	0,9
		10	25,7	—	6,4
		12	30,7	—	11,5

gesehen sinkt die Zahl der Fortpflanzungsquellen mit zunehmender Luftbewegung.

Für die Festsetzung der Lagerzeit sind das Sichtbarwerden des Mycels und das Einsetzen der Konidien- und Sporenreife maßgebend. Beide Zeitpunkte lassen sich bei Lagerung in bewegter Luft verschieben (Tabelle 2). Bei *Mucor racemosus* wird erst bei 3° C und *w* — 12 cm/sec das Erscheinen des Mycels etwas verzogert *Penicillium flavo-glaucum* kommt bei 6° und 12 cm/sec sogar etwas fruher, was sich deckt mit den Erfahrungen beim Wachstum in ruhender Luft. Auch da erschien das Mycel bei niederen Feuchtigkeiten eher als bei relativ hohen Feuchtigkeiten. Bei der praktischen Kaltlagerung von Fleisch sind also bei schwacher Luftbewegung innerhalb des zulässigen Feuchtigkeitsbereichs keine nennenswerten Einwirkungen auf eine Pilzinfektion zu erwarten. Es bleibt noch festzustellen, ob etwa eine durch vorübergehende stärkere

Luftumwälzung bei Beginn der Lagerung bewirkte Abtrocknung der Oberflächen die Pilzentwicklung deutlicher hemmt. Unsere Untersuchungen weisen darauf hin, daß es ratsam ist, nach weiteren Maßnahmen (vgl. *Plank* 1933) zu suchen, die neben der Kälteanwendung zur Verbesserung der Lagerungsverhältnisse beitragen können.

Tabelle II.

Sichtbarwerden der Infektion und Reife der Fortpflanzungszellen in ruhender und bewegter Luft bei $\varphi = 90\%$. Zeit in Tagen.

Untersuchter Pilz		Lagertemperatur °C	Luftgeschwindigkeit in cm/sec 0	5	12
Penicillium flavo-glaucum	Sichtbarwerden der Infektion	+ 6	6	6	$5^1/_2$
	Beginn der Konidienreife	+ 6	9	9	9
Mucor racemosus	Sichtbarwerden der Infektion	+ 6	3	3	3
		+ 3	$4^1/_2$	—	5
	Beginn der Sporenreife	+ 6	4	4	4
		+ 3	6	—	7

Zusammenfassung.

1. Die Verwendung aufgezwungener Luftströmung von 5 und 12 cm/sec führte bei *Penicillium flavo-glaucum* und *Mucor racemosus* bei den Temperaturen 6 und 3° C und bei einer Luftfeuchtigkeit von 90 % zu Wachstumsverzögerungen, verglichen mit dem Verhalten in ruhender Luft.

2. Die Verzögerung wird um so stärker, je höher die Geschwindigkeit der Luft ist.

3. Strömt die Luft senkrecht zur Infektionsfläche, so wird eine stärkere Hemmung erzielt als bei paralleler Strömung.

4. Die Wachstumshemmung ist auf eine Zunahme des Quellungsdruckes und des osmotischen Druckes an der Fleischoberfläche infolge der Vergrößerung der Verdunstungszahl bei bewegter Luft zurückzuführen.

5. Die erzielte Wachstumshemmung ist zu gering, um eine nennenswerte Verlängerung der Lagerzeit zu bewirken.

6. Die günstige Wirkung der Luftumwälzung im Kühlraum beruht also nicht auf einer direkten Einwirkung auf die Pilzinfektion, sondern darauf, daß örtliche und zeitliche Temperatur- und Feuchtigkeitsunterschiede vermindert werden und ihr Ausgleich schneller erfolgt.

7. Für die allein durch Kontrolle des Luftzustandes erreichbare Hemmung der Schimmelpilzentwicklung ergibt sich eine Betriebsweise, bei der die Temperatur möglichst niedrig gehalten wird, die relative Luftfeuchtigkeit einen Wert von rund 90 % nicht überschreitet, und die Luftbewegung so gering ist, daß gerade der gewünschte Luftzustand überall im Kühlraum erhalten bleibt.

Literatur.

W. H. Carrier u. *D. C. Lindsay*, Refr. Eng. **11**, 241, 1925. — *A. Gramberg*, Maschinentechn. Versuchswesen. Bd I. Berlin 1933. — *R. B. Haines* u. *E. C. Smith*, Rep. of the Food Investigation Board, S. 18, 1932. — *W. K. Lewis*, Mech. Eng. **44**, 445, 1922. — *K. Linge*, Zeitschr. f. d. ges. Kalte-Ind. **36**, 189, 1929. — *F. Merkel*, VDI-Forschungsheft Nr. 275. Berlin 1925. — *R. Mollier*, Zeitschr. VDI. **67**, 869, 1923. — *R. Plank*, Gesundheitsing. **56**, 413, 1933. — *W. Schwartz* u. *G. Kaeß*, Arch. f. Mikrobiologie **5**. 157, 1934.

(Aus dem Mikrobiologischen Laboratorium der Akademie der Wissenschaften Leningrad, USSR.)

Struktur und Entwicklungsgeschichte des Granulobacter pectinovorum (Fribes).

Von

A. Imšenecki.

Mit 3 Textabbildungen und Tafel II und III.

(Eingegangen am 22. Mai 1934.)

Mit den Untersuchungen von *Löhnis, Almquist, Hadley* und *Enderlein* schien sich eine neue Entwicklung der Bakteriologie anzubahnen. Dieser neuen Richtung liegen nicht allein die Untersuchungen der obengenannten Forscher, sondern auch ältere Arbeiten zugrunde, zumal sogar aus der Zeit, wo die Anschauungen der Monomorphisten vorherrschend waren, Beobachtungen über den Pleomorphismus der Bakterien vorliegen. Diese Beobachtungen sind von *Löhnis* zusammengefaßt und bearbeitet worden.

In der darauffolgenden Periode ergab die Erforschung der Entwicklungsgeschichte verschiedener Formen: *B. mycoides* (*Nyberg, Oesterle* und *Stahl, Stapp* und *Zycha, Lewis, den Dooren de Jong* u. a.), *B. megaterium* (*Petschenko, Kudrjawzew, Knaysi*), *Azotobacter* (*Krassilnikow, de Regel* u. a.), *B. maloaceearum* (*Stoughton*), *B. saccharobutyricus* (*Cunningham*), *Spirochaeta cytophaga* (*Krzemieniewska, Issatschenko* und *Wackenhut, Rokitzkaja*), *Milchsäurebakterien* (*Rudakow*), *Essigsäurebakterien* (*Batschinskaja*) usw., ein ausgiebiges, aber wenig einheitliches Tatsachenmaterial. Es unterliegt jedoch keinem Zweifel, daß einige der aufgezählten Arbeiten neue, von der üblichen Teilung abweichende Formen der Bakterienvermehrung festgestellt haben, so daß die Bakterien jetzt durch die frühere Bezeichnung *Schizomycetes* schon nicht mehr erschöpfend charakterisiert werden.

Im Jahre 1912 schrieb *A. Meyer*, die Befunde *Dobell*s kritisierend: „Wie gering die biologische Orientierung des Autors über die Bakterien im allgemeinen ist, geht übrigens daraus hervor, daß er noch an den Pleomorphismus der Bakterien glaubt."

Dieser Satz stellt nichts anderes dar als eine Widerspiegelung der damals vorhandenen Anschauungen. Im Laufe der nächsten 20 Jahre haben die Anschauungen der Mikrobiologen über den Pleomorphismus der Bakterien eine gewisse Modifizierung erfahren; die Zahl der in diesem Sinne ausgeführten Arbeiten nimmt immer zu. Es ist jedoch bis jetzt nicht zu einer einheitlichen Auffassung gekommen, weil einige Sätze des Pleomorphismus noch einer sorgfältigen Prüfung bedürfen. Eine der wichtigsten und grundsätzlichsten Streitfragen bezieht sich auf das Vermögen der neu entstehenden Zellen, sich zu vermehren und sich in die Ausgangsform zurückzuverwandeln. Sind die Phasen der individuellen Entwicklung der Bakterien so aufzufassen, als mache dieses oder jenes Individuum verschiedene Stadien durch, oder treten bei dieser Metamorphose nacheinander verschieden gestaltete Generationen auf? Die auf dem Gebiet der allgemeinen, sowie der landwirtschaftlichen Mikrobiologie ermittelten Befunde

bestätigen vorwiegend die erste Deutung, während die medizinische Literatur Hinweise auf die Richtigkeit der zweiten Vermutung gibt. Die auf Grund ihrer eigenen Beobachtungen gebildete, verschiedene Stellung der Verfasser zum Vorkommen von Gonidien, von filtrierbaren Formen und insbesondere von Symplasma und Konjunktion führt zu höchst bunten Deutungen des Problems vom Lebenszyklus der Bakterien.

Einige Schwierigkeiten treten auch in der Terminologie auf. Die von *Enderlein* und *Almquist* vorgeschlagenen Bezeichnungen haben sich nicht eingebürgert. Wird von *Löhnis*' Nomenklatur Gebrauch gemacht, so treten beim Identifizieren der beobachteten zelligen Gebilde mit diesem oder jenem Typus der von *Löhnis* beschriebenen Reproduktionsformen Schwierigkeiten auf. Anscheinend wird eine genauere und dabei vereinfachte Nomenklatur erst nach einer ausführlichen Erforschung der Entwicklungsgeschichte der Vertreter verschiedener Bakteriengruppen möglich sein. In der Erforschung der Entwicklungsgeschichte der Organismen erlangt die Untersuchungsmethode eine besondere Bedeutung. Es ist unmöglich, die Richtigkeit der Meinung *Stapp*s nicht anzuerkennen, daß das Vorkommen eines Entwicklungszyklus bei den Bakterien experimentelle Beweise erfordert.

Nur auf dem Wege unmittelbarer und natürlich zeitraubender Beobachtung kann das Tatsachenmaterial gesammelt werden, das zur endgültigen Lösung dieser komplizierten Probleme führen wird. In dieser Hinsicht stellen Beobachtungen im Hängetropfen eine der wenigen Untersuchungsmethoden dar, die es gestatten, die in der Zelle eintretenden Veränderungen Schritt für Schritt zu verfolgen. Eine Erforschung der Phasen der individuellen Entwicklung dagegen, die sich lediglich auf das Durchmustern gefärbter Präparate gründet, kann zu unrichtigen Schlüssen führen.

Wir wurden zu der Erforschung der Struktur und der Geschichte des *Granulobacter pectinovorum* deshalb veranlaßt, weil es in den Schriften an ausführlichen Angaben bezüglich des Lebenszyklus anaerober Bakterien fehlt. Andererseits bestärkten unseren Entschluß, in dieser Richtung Arbeiten zu unternehmen, die industrielle Bedeutung dieses morphologisch wenig erforschten Mikroorganismus sowie seine bedeutende Größe, die die cytologischen Untersuchungen erleichtert. Das Bakterium der Flachsröste ist in reiner Kultur zum erstenmal von *Fribes* gewonnen und unter der Bezeichnung *Granulobacter pectinovorum* von *Winogradsky* 1895 beschrieben worden. In dieser Arbeit wurden die Methoden des Kultivierens dieses Mikroorganismus, ferner seine morphologischen und physiologischen Eigenschaften angegeben.

Die Beschreibung der Morphologie ist so kurz, daß wir sie in ihrem vollen Umfange hier wiedergeben: „C'est un bacille relativement grand, formant des spores dans des gonflements terminaux (forme têtard). A l'état jeune, ses articles sont longs de 10 μ a 15 μ sur une épaisseur de 0,8 μ; souvent on trouve des filaments articulés beaucoup plus longs; ils deviennent ensuite un peu plus épais (1 μ) et forment alors des gonflements ovoïdes longs de 3 μ sur 2 μ d'épaisseur; la spore ovoïde qui s'y forme a 1,8 μ sur 1,2 μ.“

Angaben über die Morphologie von *Gr. pectinovorum* finden sich auch bei *Beijerinck* und *van Delden*, *Bredemann*, *Behrens*, *Ruschmann* und *Bavendamm*. Obwohl die systematische Stellung des *Gr. pectinovorum* hier nicht berücksichtigt wird, so sei doch darauf hingewiesen, daß seine morphologischen und physiologischen Besonderheiten, seine Existenz als selbständige Art sowie seine Identifizierung mit *B. amylobacter* (*Clostridium Pasteurianum*), die seinerzeit von *Bredemann* vorgenommen und in die Bestimmungstabellen der Bakterien (*Bergey*) übernommen worden ist, nicht frei von ernsten Einwendungen sind. Unter den uns zugänglichen Schriften sind die obenerwähnten die einzigen, in denen Angaben über die Morphologie des *Gr. pectinovorum* vorkommen.

Gehen wir nun zur Darlegung unserer eigenen Befunde über.

Untersuchungsmethode.

Unsere Untersuchungen sind an zwei *Gr. pectinovorum*-Stämmen ausgeführt worden, die wir vom Institut für landwirtschaftliche Mikrobiologie erhalten hatten. Beide Stämme wurden aus Flachs, der dem Rösten unterzogen war, gezüchtet und auf Kartoffelnährboden kultiviert. Der morphologischen Erforschung ging die Herstellung reiner, jeweils einer einzelnen Spore entstammender Kulturen voraus. Hierzu haben wir aus einer alten, 40tägigen, nur Sporen enthaltenden Kultur eine Sporenaufschwemmung in steriler physiologischer Losung bereitet. Kleine Tropfen dieser Aufschwemmung wurden zu je 15 bis 20 auf ein Deckgläschen gebracht, das dann einem hohlgeschliffenen Objektträger aufgesetzt wurde. Jeder Tropfen, in dem bei sorgfältigem Nachprüfen unter stärkerer Vergrößerung nur eine einzelne Spore nachzuweisen war, wurde mit Hilfe eines kleinen Stückchens Filtrierpapier in ein Reagensglas gebracht, das Nährsubstrat enthielt.

Da mit der Moglichkeit zu rechnen war, daß in älteren Kulturen kleine, schwer erkennbare vegetative Formen vorkommen können, wurde die Aufschwemmung einem fünfminütigen Erhitzen auf 55° unterworfen. Das hatte eine Minderung der Zahl der wachstumsfähigen Sporen zur Folge. Wir wollen uns nicht bei der Frage aufhalten, wie weit es möglich ist, eine Kultur aus einer einzelnen Zelle zu erhalten; wir halten es jedoch, im Zusammenhang mit den neueren Befunden über die Entwicklungsgeschichte der Bakterien, für angebracht, darauf hinzuweisen, daß für asporogene Formen die Herstellung einer, einer einzelnen Zelle entstammenden Kultur bedeutende Schwierigkeiten bietet. Es könnte hingegen scheinen, daß es bei sporenbildenden Bakterien ein leichtes sei, sich durch Pasteurisation des sporenenthaltenden Ausgangsmaterials der anderen Formen zu entledigen. Jedoch ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß die kleineren Formen thermoresistenter sind als die gewöhnlichen vegetativen Zellen. Dieses erschwert auch bei sporenbildenden Bakterien das Erhalten der Kulturen aus einer einzelnen Zelle, insbesondere bei Arten mit Sporen ohne hohe Thermoresistenz. Denn wir gebrauchen bei einem derartigen Material hohe Temperaturen, was zur Folge hat, daß der Prozentsatz mißglückender (im Sinne ihres weiteren Wachstums) Einsporkulturen sehr hoch ist.

Die aus einer Spore dargestellten *Gr. pectinovorum*-Stämme wurden vorwiegend in flüssigem, Kartoffel enthaltendem Substrat kultiviert (feinzerteilte Kartoffeln 10 Teile, Glucose 1 Teil, Kreide 2 Teile, Leitungswasser 100 Teile, p_H des Substrats 7,0). Im Text wird dieses Substrat als K/S bezeichnet). Von da aus wurden Reagensgläser beimpft, die kleine, von Wasser bedeckten Flachsgarben und Kreide enthielten. Die Flüssigkeit stand in beiden Fällen genügend hoch, um die Entwicklung der Anaeroben zu ermöglichen. Seltener wurde Kartoffelagar (10 Teile Kartoffel, 1 Teil Glucose, 2 Teile Agaragar, 100 Teile Wasser) oder Kartoffelgelatine (10 Teile Kartoffel, 1 Teil Glucose, 10 Teile Gelatine, 100 Teile Wasser) verwendet. Auf diesen Substraten wurden Kulturen in Reagensgläsern hergestellt, die in Zylindern mit alkalischer Pyrogallollösung gehalten wurden; teilweise wurden auch Stichkulturen gemacht.

Die beimpften Reagensgläser wurden im Thermostaten bei 35° gehalten. Bei dieser Temperatur ließ sich in Reagensgläsern mit K/S bereits nach 24 Stunden kräftige Bildung von Gasbläschen beobachten, und es kamen kleine Kartoffelstückchen auf die Oberfläche. Bei Erforschung des Baues und der Entwicklungsgeschichte des *Gr. pectinovorum* kombinierten wir die Erforschung lebender, Kulturen verschiedenen Alters entnommener Zellen mit der Methode der direkten Beobachtung der Entwicklung des Mikroorganismus im Hängetropfen. Von diesen beiden einander kontrollierenden und ergänzenden Methoden haben wir gleichzeitig Gebrauch gemacht. Das Alter der Kulturen, denen das Untersuchungsmaterial entnommen wurde, betrug 5 Stunden bis 90 Tage. Der Zeitabstand, in dem die Beobachtungen ausgeführt wurden, war verschieden je nach dem Alter der Kultur: für bis einschließlich 72 Stunden alte Kulturen wurde ein Zeitabstand von 30 Minuten bis 2 Stunden genommen, an älteren Kulturen wurden Beobachtungen alle 24 Stunden ausgeführt. Beobachtungen im hängenden Tropfen wurden auf dem Wege der von uns ausgearbeiteten Methode ausgeführt. Beim Montieren im Hängetropfen ist für die Anaeroben eine kleine Schale mit alkalischer Pyrogallollösung in die Kammer, die durch den an das Objektglas angeklebten Ring gebildet wird, zu bringen. Ein Tropfen des Nährsubstrats, der den anaeroben Mikroorganismus enthält, wird auf ein Deckglas aufgetragen und mit diesem wird der Ring, dessen Rand mit Vaseline beschmiert ist, bedeckt. Wie es sich im Laufe der Arbeit herausgestellt hat, vermögen die Anaeroben in einem größeren hängenden Tropfen des Nährsubstrats auch ohne Aufnahme des Sauerstoffs durch Pyrogallol bzw. durch speziell nach *Fortners* Methode ausgeführte Beimpfungen mit aeroben Bakterien sich zu entwickeln. Eine ausführlichere Beschreibung der von uns angewendeten Methode sowie eine vergleichende Wertung der verschiedenen Kulturmethoden im hängenden Tropfen haben wir an anderer Stelle gegeben.

Die obenbeschriebene kombinierte Methode der Erforschung der Struktur des Flachsröstebakteriums und der individuellen Entwicklungsphasen hat uns die Befunde ermöglicht, zu deren Darlegung wir jetzt übergehen.

Entwicklungsgeschichte.

Junge Zellen des *Gr. pectinovorum* haben Stäbchengestalt; ihre Enden sind etwas abgerundet. Die Stäbchen haben durchschnittlich eine Größe von $0,5 \times 3,2\ \mu$. Sie sind lebhaft beweglich und vermehren

sich durch einfache Querteilung. Nach erfolgter Zellteilung bleiben die Zellen des öfteren paarweise verbunden (Taf. II, 1). Das Zellprotoplasma ist homogen, es ist schwach lichtbrechend und weist, ungefärbt, keine Körnchen auf. Die Stäbchen vergrößern sich allmählich, ihre zylindrische Gestalt behaltend, und werden schließlich 0,6 × 4,5 bis 8 μ groß. Nach und nach tritt Herabsetzung ihrer Beweglichkeit ein, sie hören auf sich zu teilen, und ihre Cytoplasma wird körnig. Die fernere Größenzunahme der Stäbchen erfolgt vorwiegend in die Breite (0,8 bis 1 μ × 6,5 bis 8,5 μ) und wird von einer Veränderung der Gestalt begleitet. Eines der Stäbchenenden wird kolbenartig verdickt; dies ist in ungefärbten Präparaten das erste Zeichen des Beginns der Sporenbildung (Taf. II, 2). Bei kürzeren und dickeren Stäbchen tritt, zusammen mit dem Breiterwerden eines der Enden, eine gewisse Verengung des mittleren Teiles der Zelle ein; dies führt zum Auftreten von Zellen, wie sie auf Taf. II, 2 dargestellt sind. Bei aufmerksamer Betrachtung läßt sich im verdickten Stäbchenende ein lichtbrechendes Körnchen von geringer Größe nachweisen. Gleichzeitig kommt in der Mitte des Stäbchens eine ovale oder rundliche, undeutlich abgegrenzte Vakuole zum Vorschein. Das am Ende des Stäbchens gelagerte Körnchen wird immer größer und nimmt ovale Gestalt an. Zusammen mit dem Größerwerden der Prospore findet eine stärkere Schwellung des Stäbchenendes sowie der Vakuole statt, die um diese Zeit den ganzen Querdurchmesser des Stäbchens einnimmt, und deren Grenzlinie halbmondförmig, ja fast geradlinig ist (Taf. II, 3). Darauf schrumpft die Prospore, ihr Lichtbrechungsvermögen wird stärker, und sie wird von einer Hülle umgeben, wahrend am Sporpole ein kleiner, heller „Hof" auftritt (Taf. II, 4). Gegen Abschluß der Sporenbildung wird das Stäbchen etwas länger und dunner. Es verschwindet auch der ihm früher zukommende allmähliche Übergang in den verbreiterten Teil (Taf. II, 5). Die Größe der reifen Plektridien (Trommelschlägelstadium) beträgt durchschnittlich 0,9 × 9,2 μ; mitunter werden auch Zellen von 17 bis 19 μ Länge angetroffen. Ein Teil der in Sporenbildung begriffenen Zellen krümmt sich. Die Sporenbildung ist immer terminal; es kommt vor, daß sie bei zwei noch miteinander verbundenen Stäbchen gleichzeitig bei beiden auftritt (Taf. II, 5). Zwei Sporen in *einem* Stäbchen haben wir nie zu sehen bekommen. In den Stäbchen mit völlig reifer Spore kann es vorkommen, daß deren Achse nicht mit der Stäbchenachse zusammenfällt (Taf. II, 4a). Nachdem die Spore ihre endgültige Gestalt erlangt hat, tritt Zerstörung des Stäbchens ein; es wird durchsichtig, daher weniger deutlich sichtbar, später unterliegt es der Autolyse. An der Spore bleibt nur ein Stäbchenrest als Anhängsel haften, das aber auch bald verschwindet (Taf. II, 6). Es kommt vor, daß die in Zerstörung begriffene Zelle in einigem Abstande von der Spore abbricht;

Erklärung zur Tafel II.

1. Junge Zellen des *Gr. pectinovorum.*
2. Größere verdickte Stäbchen mit einer in Bildung begriffenen Vakuole.
3. Zellen mit keulenartigen Enden und großer Vakuole.
4. Stadium der reifen Plektridien. Am Pole der Spore ein heller Hof. 4 *a* die Sporenachse fällt nicht mit der Stäbchenachse zusammen.
5. Sporenbildung bei zwei miteinander verbundenen Zellen.
6. und 7. Sporen mit Zellresten.
8. Freie Sporen.
9. bis 12. Auskeimen der freien Sporen.
13. Auskeimen der Plektridien.
14. Auskeimen der Spore.
15. Spindelartige, aus Sporen entstandene Zellformen.
16. Teilung der aus Sporen entstandenen Zellen.
17. Atypische Keimung der Spore. Infolge der geringen Dimension der Ausgangsöffnung in der Sporenhülle verlagert sich der Inhalt der Zelle sehr rasch in das Ende des Stäbchens, das dadurch keilförmig wird.
18. Allmähliche Loslösung der Knospe von der Mutterzelle und Verwandlung in die Stäbchenform.
19, 20, 21 und 22. Zellen mit endständigen Knospen.
23. Geschlängelte Involutionsformen.
24. Riesenplektridien, die unter Einfluß der eigenen Stoffwechselprodukte entstehen.
25. Zellen des *Gr. pectinovorum*, die beim gemeinsamen Kultivieren mit *Bac. mesentericus var. ruber* eine Formveränderung erfahren haben.

dann zeigt der Rest einen unregelmäßigen zackigen Rand (Taf. II, 7). Die Befreiung der Spore von den Zellresten spielt sich ziemlich schnell ab. Die reife Spore ist oval (Taf. II, 8). Die auf Grund von 300 Abmessungen ermittelte Durchschnittsgröße der Spore beträgt 1,2 × 1,6 μ. Abweichungen kommen innerhalb der Grenzen von 1,1 × 1,3 μ bis 1,5 × 1,8 μ vor.

Das Auskeimen der in ein frisches Nährsubstrat gebrachten Sporen beginnt, wie gewöhnlich, mit Anschwellung und Herabsetzung des Lichtbrechungsvermögens. Es erfolgt stets polar sowohl bei Stäbchen mit terminal gelagerter Spore (Taf. II, 13) wie auch bei freien Sporen (Taf. II, 9 bis 12) und bei solchen, die einen Teil der Zelle in Gestalt eines Anhängsels bewahrt haben (Taf. II, 14). Die Sporenkeimung dauert insgesamt, bei 35^0, 45 bis 60 Minuten und spielt sich folgendermaßen ab: Am Pole der Spore entsteht eine Öffnung, aus der das kegelförmige Ende des jungen Stäbchens heraustritt (Taf. II, 9). Dieses Ende streckt sich allmählich in die Länge, während das andere noch der inneren Oberfläche der Sporenhülle anliegt (Taf. II, 10). Daraufhin tritt das Stäbchen ganz heraus (Taf. II, 11 bis 12) und verliert jeglichen Zusammenhang mit der Sporenhülle. Diese ist nur als ein abseits liegendes Käppchen zu sehen, bei dem die Öffnung, durch die das Stäbchen herausgetreten war, deutlich zu sehen ist.

Das aus der Spore ausgekeimte Stäbchen ist spindelförmig; seine Enden sind zugespitzt (Taf. II, 15). Somit unterscheidet es sich durch seine Gestalt von den jungen vegetativen stäbchenartigen Zellen. Es mißt 1,2 bis 1,6 μ × 3,2 bis 3,4 μ. Unmittelbar nach dem Heraustreten ist das Stäbchen unbeweglich, nach Verlauf von 10 bis 15 Minuten

aber beginnt das spindelartige Stäbchen sich sehr rasch zu bewegen und teilt sich bald darauf in zwei Zellen, deren Form einer Kerzenflamme gleicht (Taf. II, 16). Sie behalten weiterhin die Spindelform bei, die aber bei ihnen weniger scharf ausgeprägt ist. Nach und nach erlangen solche Zellen die Gestalt der oben beschriebenen Zellen, indem sie dünner werden und sich in die Länge strecken.

Es können aber auch Abweichungen von der normalen Weise des Auskeimens vorkommen. Eine solche atypische Keimung dürfte als „erschwerte" Keimung gedeutet werden und ist anscheinend durch ungenügende Größe der in der Sporenhülle entstehenden Öffnung bedingt. Dies erschwert das Heraustreten des Stäbchens, das nicht, wie es gewöhnlich der Fall ist, allmählich, sondern auf einmal stattfindet. Es läßt sich verfolgen wie der Inhalt des Stäbchens in dessen peripheren, aus der Sporenhülle heraustretenden Teil herüberfließt; infolgedessen hat die Zelle beim Verlassen der Hulle keilartige Gestalt (Taf. II, 17). Anscheinend ist die Membran des Stäbchens um diese Lebensperiode fein und elastisch genug dazu. Der langsame Verlauf des Auskeimens kann auch noch dazu führen, daß das freiwerdende Stäbchen nur teilweise Beweglichkeit erlangt; es schlagt von Seite zu Seite, bis es sich von der Sporenhulle völlig befreit hat.

Die aus der Spore hervorkeimenden Stabchen sind, wie es *Schussnig* nachgewiesen hat, von den für diese Art typischen vegetativen Zellen verschieden gestaltet. In den Untersuchungen des genannten Verfassers jedoch, die an *B. caviae* ausgeführt waren, war dies durch die bohnenartige Form der Spore bedingt; das Stäbchen behielt eine Zeitlang die Gestalt der Spore bei. Bei unserem *Gr. pectinovorum* dagegen ist die Spore oval, so daß bei zahlreichen Bakterienarten die ausgekeimten Zellen von den alteren Zellen nicht besonders stark unterschieden sind.

Die obenbeschriebene Entwicklungsgeschichte der Flachsröstebakterien ist als „normale" Entwicklung aufzufassen, da diese Phasen der individuellen Entwicklung vorherrschen: Umgestaltung des kleinen, feinen, durch Teilung sich vermehrenden Stäbchens in ein größeres, an einem Ende verdicktes Gebilde, Ausbildung einer Spore im verdickten Teil (Stadium der reifen Plektridien) und schließlich Befreiung der Spore — dies ist das Schema der ublichen Entwicklung des besagten Mikroorganismus.

Gehen wir nur zur Beschreibung der von uns an *Gr. pectinovorum* beobachteten Vermehrungsweise über, die von der üblichen Teilung verschieden ist.

Am Ende des verdickten Stäbchens, das sich nicht mehr teilt und sich in dem der Sporenbildung vorangehenden Stadium befindet, entsteht eine kleine, nach und nach größer werdende Knospe. Dieses

Gebilde kann sowohl bei Formen entstehen, die ihre regelmäßige, stäbchenartige Gestalt noch beibehalten haben (Taf. II, 18, 19) wie auch in Stäbchen mit bereits keulenartig verdicktem Ende (Taf. II, 20, 21, 22).

Inmitten dieser Zellen ist eine Vakuole vorhanden. Die Knospen sind rundlich oder etwas oval, gewöhnlich 0,3 bis 0,4 μ, selten 0,8 bis 1,1 μ groß. Ihre Entstehungsweise, die in einer allmählichen Vorstülpung der Hülle am Zellpole besteht, sowie die im Vergleich zum Querdurchmesser des Stabchens geringere Knospengröße macht eine Verwechslung dieser Gebilde mit einer infolge einer unregelmäßigen Teilung des Stäbchens entstandenen Zelle unmöglich. Dem Inhalt der Knospe kommt ein stärkeres Lichtbrechungsvermögen zu als dem Zellplasma. Die Knospen entstehen in den Zellen in Einzahl; multiple Knospenbildung ist uns nicht zu Gesicht gekommen, ebensowenig Auskeimen von Knospen an jungen Zellen, die noch fähig sind, sich durch Teilung zu vermehren. Eine gewisse seitliche Verlagerung der Knospe ist das erste Zeichen der eintretenden Abtrennung der Knospe von der Mutterzelle. Sie nimmt allmahlich eine gegenüber der Stäbchenachse immer schiefere Lage ein, schließlich reißt sie ab und wird frei (Taf. II, 18). Von der Mutterzelle losgelöst, vermehrt sie sich weder durch Teilung noch durch Knospung. Eine selbständige Beweglichkeit kommt ihr nicht zu. Wir haben uns durch direkte Beobachtung vergewissern können, daß die Knospen, in das Nährsubstrat gelangt, sich durch allmähliche Streckung binnen 2 bis 3 Stunden in Stäbchen umzugestalten vermögen (Taf. II, 18). Die Menge der knospenliefernden Zellen schwankt beträchtlich. Es kommt vor, daß sie sehr zahlreich sind; dann bekommt man bei stärkerer Vergrößerung im Gesichtsfeld drei bis fünf knospentragende Zellen zu sehen. In anderen Fallen mußten wir sie suchen. Bei Bebrutung auf K/S kommen sie in 36 bis 72 Stunden alten Kulturen vor. Je älter die Kultur, desto seltener werden die knospenden Zellen; Knospen sind jedoch auch in sechstägigen Kulturen angetroffen worden. Somit werden Zellen, die an ihren Enden Knospen tragen, in Kulturen vorgefunden, in denen gleichzeitig asporogene Stäbchen, reife Plektridien und freie Sporen vorkommen.

Es gibt Zellen, in denen sich die der Sporenbildung oder Knospenentstehung vorangehenden Veränderungen nicht abspielen. Diese werden dicker und verwandeln sich durch allmähliche Streckung in lange, gerade oder gebogene Stäbchen und Fäden. Geschlängelte Formen können auch aus Zellketten entstehen, deren einzelne Glieder sich strecken und krümmen. Dies alles fuhrt zum Auftreten von unbeweglichen spirillen- bzw. bogenförmig oder anders, mitunter höchst wunderlich gestalteten Formen (Taf. II, 23). Die Fäden von größerer

Länge bestehen aus mehreren Zellen; im ungefärbten Zustande aber sind die Scheidewände zwischen diesen schwer zu unterscheiden. In geringerer Zahl werden diese Formen bereits in zweitägigen Kulturen angetroffen, am häufigsten aber in 5 bis 6 Tage alten Kulturen. In einen hangenden Tropfen gebracht, erleiden diese Fäden keine Veränderungen; sie zerfallen nicht in einzelne Zellen und ergeben auch keine Sporen oder Knospen. Beim weiteren Altern der Kultur werden die geschlangelten Formen immer seltener und lassen sich in 25- bis

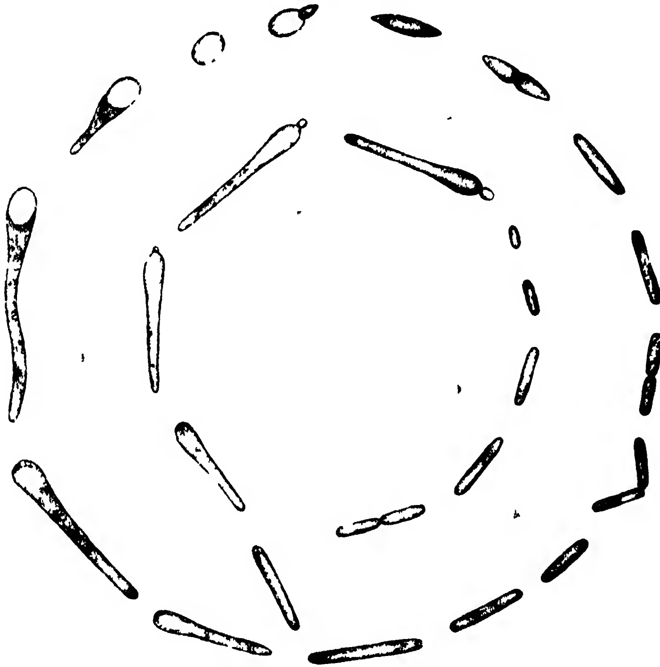


Abb. 1

90tagigen Kulturen gar nicht nachweisen. Anscheinend gehen sie allmahlich zugrunde und fallen der Zerstörung anheim.

Somit stellen Zellteilung, Sporenbildung, Entstehung von Knospen und geschlangelter Formen die Grundvorgänge dar, die mit eigenartigen morphologischen Veranderungen der Zellen einhergehen, wie dies bei der Erforschung der Entwicklung des *Gr. pectinovorum* ermittelt worden ist. Die Entwicklungsgeschichte des *Gr. pectinovorum* ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Im Laufe unserer, an lebenden Zellen angestellten Beobachtungen ist uns Symplasmabildung, Heraustreten von Gonidien oder Freiwerden

solcher durch Auflösung oder Zerreißen der Zellmembran kein einziges Mal zu Gesicht gekommen; ebensowenig sind Bilder beobachtet worden, die als ein Geschlechtsvorgang zu deuten wären. In gefärbten Präparaten wurden allerdings bald kleinere, bald größere, der Zellmembran von außen anhaftende Körnchen vorgefunden, die an Gonidien oder Exosporen erinnern. Da wir aber dies an ungefärbten Präparaten nicht gesehen haben, so schreiben wir diesen Beobachtungen keinen besonderen Wert bei.

Versuche mit Filtration der Kulturen.

Methode. Kolben von 1 Liter Inhalt mit 800 ccm K/S wurden mit einer aus einer einzelnen Spore gezüchteten *Gr. pectinovorum*-Kultur beimpft und bei 35° bebrütet. Kulturen verschiedenen Alters wurden durch *Chamberland*-Kerze L_3 unter sehr geringem Unterdruck filtriert. Mit je 10 ccm des Filtrats wurden Kolben beimpft, die bis zu 900 ccm K/S enthielten. Es mußte so viel Kulturflüssigkeit genommen werden, um die Wirkung der den Mikroorganismen entstammenden Stoffwechselprodukte, die mit den Filtraten zusammen eingeführt wurden, herabzusetzen[1]. Die Kolben wurden in einen auf 35° eingestellten Thermostaten gebracht und dort 25 bis 30 Tage gehalten. Die Kerzen wurden durch Filtration von *B. prodigiosum*-Kulturen geprüft.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle I angegeben.

Tabelle I.

Filtration der *Gr. pectinovorum*-Kulturen.

Alter der Kulturen	Zahl der Versuche	Zahl der positiven Ergebnisse	Beginn des sichtbaren Wachstums
24 Std.	7	1	am 3. Tage
48 „	7	0	—
72 „	6	1	am 2. Tage
96 „	4	1	„ 3. „
6 bis 7 Tage	4	1	„ 3. „
11 bis 13 Tage	6	1	„ 2. „
Gesamtzahl der Versuche	34		
Zahl der positiven Ergebnisse		5	

Unter 34 Fällen ist also in 5 Fällen bei Impfung des Filtrats in K/S enthaltende Kolbengläser Wachstum des *Gr. pectinovorum* beobachtet worden. Es läßt sich aus der Tabelle I ersehen, daß zwischen

[1] Da die filtrierbaren Formen materielle Partikelchen darstellen, so suchten wir sie im Zentrifugat anzureichern. Dies hätte uns den Versuch ermöglicht, die Entwicklung der filtrierbaren Formen im hängenden Tropfen zu verfolgen. Zu diesem Zwecke zentrifugierten wir das Filtrat, saugten fast den ganzen Inhalt des Reagensglases ab und wiederholten die Zentrifugierung nach Zugabe einer neuen Portion des Filtrats. Diese Versuche sind mißglückt: nach dreimaliger Wiederholung des beschriebenen Verfahrens erwies sich das Filtrat durch fremde Mikroorganismen infiziert.

dem Alter der Kultur und dem Vorfinden filtrierbarer Formen kein Zusammenhang besteht. Diese werden sowohl in jungen wie in alten Kulturen getroffen. Wachstum trat in den Kolben mit geimpftem Filtrat am zweiten bis dritten Tage nach Impfung ein. Wir haben nie Wachstumsbeginn nach einem längeren Verbleiben der filtrierbaren Formen im Nährboden beobachten können. In den allerersten Stadien des sichtbaren Wachstums ließen sich unter dem Mikroskop typische *Gr. pectinovorum*-Stäbchen nachweisen. Im weiteren unterlagen diese sämtlich den oben beschriebenen morphologischen Veränderungen. Auch bei Überimpfungen waren diese Kulturen in nichts vom Ausgangsstamm verschieden.

Beständigkeit gegenüber hohen Temperaturen.

Methode. Zur Bestimmung der Thermostabilitat der vegetativen Zellen verwendeten wir achtstündige Kulturen auf K/S bei 35°; 0,5 ccm dieser Kultur wurden zu 5 ccm sterilem Leitungswasser zugegeben, und diese Zellaufschwemmung wurde zu je 1 ccm in Reagensgläser gegossen. Diese wurden in Wasser von verschiedener Temperatur gestellt und darin eine bestimmte Zeit gehalten. Die erhitzten Reagensglaser wurden rasch gekühlt und mit ihrem Inhalt K/S Reagensglaser beimpft. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle II dargestellt.

Tabelle II.

Thermostabilitat der vegetativen Zellen des *Gr. pectinovorum*.

Dauer des Erhitzens	Temperatur 45°	48°	50°	53°	55°	58°	60°	Kontrolle
5 Minuten	+	+	[illegible]	—	—	—	—	+
	[illegible]	+	+	—	—			+
	+	+	—	—	—	—	—	+
10 Minuten	+		—	—	—	—	—	+
	[illegible]	+	—	—	—	—	—	+
	+		—	—	—	—	—	+

Aus den Angaben der Tabelle II ist zu ersehen, daß sämtliche vegetativen Zellen bei 53° binnen 5 Minuten und bei 50° binnen 10 Minuten zugrunde gehen. Die Thermostabilität der jungen (achtstündigen) Kulturen entstammenden Zellen wurde deshalb untersucht, weil die Widerstandsfähigkeit 18 bis 22 Stunden alter Kulturen höheren Temperaturen gegenüber sehr stark schwankte. Dies muß wohl von der Anwesenheit einzelner Sporen (Prosporen) in den Kulturen und vielleicht auch von resistenteren Knospen herrühren.

Zur Erforschung der Thermostabilität der reifen, alten (10 bis 12tägigen) Kulturen entstammenden Sporen machten wir von der oben beschriebenen Methode Gebrauch. Das Vermögen, eine Tem-

peratur von 100° auszuhalten, wurde durch Kochen einer wässerigen Aufschwemmung der Sporen bestimmt. Wir führen in Tabelle III die ermittelten Befunde an.

Tabelle III.

Thermostabilität der reifen *Gr. pectinovorum*-Sporen.

Dauer des Erhitzens	Temperatur						Kontrolle
	85°			100°			
1 Minute	+	+	+	+	+	+	+
3 Minuten	+	+	+	—	—	—	+
5 „	+	—	+	—	—	—	+
7 „		—	+	—	-	—	+
10 „	—	—	—	—	—	-	+

In Anbetracht dessen, daß eine Temperatur von 85° binnen 10 Minuten die Sporen abtötet, während bei 100° dieses binnen 3 Minuten geschieht, darf *Gr. pectinovorum* nicht zu den thermoresistenten sporenbildenden Bakterien gerechnet werden.

Cytologische Untersuchungen.

Wir haben in diesen Untersuchungen zwei Ziele verfolgt, nämlich: Erforschung der Veränderungen, die im Bau der Bakterienzelle während der verschiedenen Phasen ihrer individuellen Entwicklung eintreten, und ferner Vergleiche der also ermittelten Befunde mit den Ergebnissen der an lebenden Zellen ausgeführten Beobachtungen.

Methode. Das Material entnahmen wir Kulturen verschiedenen Alters und auch solchen, die im Hängetropfen bebrütet waren. Die Fixierung der Ausstriche erfolgte mit Essigsäure- oder Osmiumsäuredampfen, oder es wurden dazu die Fixierungsflüssigkeiten nach *Nawaschin* oder *Lawdowsky* benutzt. Die Praparate wurden gefarbt mit Eisenhämatoxylin nach *Ehrlich*, Carbolfuchsin, Methylenblau nach *Giemsa* und mit Methylgrün.

Für die sogenannte Vitalfarbung wurde wässerige Neutralrotlosung in Konzentrationen von 1 : 100000 bis 1 : 5000 verwendet. Die Reaktion auf Granulose wurde mit Lugollosung und 1 %igem Jodalkohol ausgeführt. Neben der Farbung fixierter Präparate verwendeten wir auch noch progressive Färbung. Diese besteht darin, daß der Farbstoff oder das Reagens unter das Deckglas in kleiner Menge mit einer Pipette eingeführt wird. Die Färbung erfolgt allmählich, was gewisse Vorteile bietet. Die Geißeln wurden nach *Löffler* (Modifikation nach *A. Meyer*, ohne Erhitzen) und auch nach *Benignetti* gefarbt. Da ein Vergleich der Ergebnisse der Farbung mit „Kernfarbstoffen“ mit der Reaktion auf Nucleinsäuren vom Typus der Thymonucleinsäure nach *Feulgen* von Interesse war, haben wir Untersuchungen mit fuchsinschwefliger Säure angestellt. Wir verwendeten dabei folgende Methode: mit Dämpfen von Essig- bzw. Osmiumsäure fixierte Präparate wurden 48 Stunden in 96°igem Alkohol gebracht. Die Hydrolyse wurde mit n/10 HCl bei 60° während 5 bis 7 Minuten vorgenommen. Die aus der erhitzten Salzsäure herausgenommenen Präparate wurden 2 bis 3 Minuten in eine kalte n/10 HCl-Lösung und daraufhin

3,5 Stunden in fuchsinschweflige Lösung gebracht. Die spätere Spülung mit SO_2-haltigem Wasser wurde aufeinanderfolgend in drei Küvetten ausgeführt; in jeder von diesen wurde das Präparat 6 bis 7 Minuten lang gehalten. Um der möglichen Spaltung der fuchsinschwefligen Säure vorzubeugen, war die Abschlußspülung im Wasser sehr kurz – 1 bis 2 Minuten. Dann wurden die Praparate entweder abgetrocknet und unmittelbar darauf untersucht, oder sie wurden durch Alkoholreihe und Xylol geführt und in Kanadabalsam eingeschlossen. Als Kontrolle dienten uns Präparate, die Hydrolyse nicht erfahren hatten, im übrigen aber in derselben Weise bearbeitet worden waren.

Der erhaltene Farbton wurde mit dem Farbton des *Saccharomyces cerevisiae*-Kernes (*Rochlina*) verglichen. Wir vermieden es, in unseren Untersuchungen Nachfarbung anzuwenden, da infolge von Nachfärbung das Bild weniger Einzelheiten zeigen konnte.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Chromatinverteilung in den verschiedenen Stadien der Stäbchenentwicklung geschenkt. Bei Eisenhämatoxylinfärbung werden in jungeren Stäbchen zwei an den Polen gelagerte Körnchen sowie die feine Körnelung gefärbt, die vorwiegend im mittleren Drittel der Bakterienzelle gelagert ist (Taf. III, 1). Eine derartige Verteilung des Chromatins hat vieles gemeinsam mit den von *Guilliermond* bei Bakterien festgestellten Strukturen. Parallel mit der Streckung des Stäbchens geht Ansammlung der feinen Körnelung zu einem linsenförmigen Gebilde einher, das inmitten der Zelle zu liegen kommt und fast ebenso breit wie der Querdurchmesser der Zelle ist (Taf. III, 1a). Dieses Gebilde nimmt später Achterform an; die Membran des Bakteriums zieht sich an der der Zerschnürung des Chromatinkernes entsprechenden Stelle ein, die Zelle wird also in zwei Tochterzellen geteilt, von denen jede zwei Polarkörnchen enthält. In den Stäbchen, die ihre Teilung eingestellt haben, und die sich vor der Sporenbildung befinden, wird eines der an den Zellenden gelagerten Körner größer, erlangt eine ovale Form und beginnt, intensiver Farbe aufzunehmen. Dies erfolgt noch vor dem Auftreten einer terminalen Anschwellung des Stäbchens, die für Zellen bezeichnend ist, welche sich zur Sporenbildung anschicken. Das im entgegengesetzten Zellende gelagerte Chromatinkörnchen färbt sich schwächer und kommt ins mittlere Drittel der Zelle zu liegen. Dabei verschmelzen die feinen Körnchen zu ein bis zwei größeren, in der Mitte der Zelle liegenden rundlichen Körperchen, deren Färbungsintensität der des vergrößerten polargelagerten Körnchens nachsteht. Also bestehen in der Zelle im Anfangsstadium der Sporenbildung ein ovales polar gelagertes, intensiv sich färbendes Körnchen und zwei bis drei blasser sich färbende kugelartige Gebilde im mittleren Zelldrittel (Taf. III, 2). Daraufhin findet Verschmelzen der zwei bis drei Körnchen in eine gemeinsame Masse statt, die eine ovale Form erlangt und die ganze Breite der Zelle einnimmt (Taf. III, 3).

Erklärung zu Tafel III.

1. Chromatinkörnchen in jungen Zellen des *Gr pectinovorum*, *a* großes, durch Verschmelzen kleinerer Körnchen entstehendes Chromatinkörperchen

2. Bildung großer Chromatinkörnchen und Größerwerden des Polkörnchens.

3. Beginn der Prosporenbildung. Die Chromatinkörnchen rücken aneinander heran und verschmelzen zu einer schwächer sich färbenden Masse, die in der Mitte der Zelle gelagert ist. Am Ende einer jeden Zelle befindet sich eine Prospore

4. bis 10. Allmähliches Größerwerden der Prospore, quergelagerte Chromatinzonen als Clitella.

11. bis 14. Stäbchen mit reifen Sporen und chromophilen Zonen.

15. Großes Chromatinkörnchen in Zellen, die aus Sporen ausgekeimt sind.

16. Teilung des Chromatinkörperchens in den aus Sporen entstandenen Zellen, die der Zellteilung vorangeht.

17. bis 20. Zellen mit Farbe aufnehmenden Knospen und chromophilen Zonen.

21. bis 28. Prosporen, Clitella, Chromatinkörnchen und Knospen (*Feulgens* Reaktion).

29. Junge Zellen, die Granulosereaktion nicht aufweisen

30. bis 32. Anfangsstadien der Granuloseablagerung in den Zellen [1].

33. bis 34. Später auftretende größere Granulosekörnchen.

35. Endständige Knospe, in der Granulose nicht enthalten ist Die Zelle ist diffus gefärbt.

36. Reaktion auf Granulose in reifen Plektridien Sporen und Vakuole weisen keine Granulose auf.

37. Kleine Granulosekörnchen in den Zellresten, die als Anhängsel an der Spore haften.

38. Peritrich verteilte Geißeln junger Zellen.

[1] Die Granulose ist schwarz gehalten, da von einer farbigen Wiedergabe (blau) abgesehen wurde

Kurze Zeit nach Verschmelzen der Körnchen treten in gefärbten Präparaten die Konturen der Vakuole hervor, deren Inhalt als dunkel gefärbter Streifen auftritt. Dieses „Clitellum" ist senkrecht zur Stäbchenachse gelagert; es nimmt den ganzen Querdurchmesser der Zelle ein, läßt sich mit verschiedenen Farben intensiv färben, ergibt keine Reaktion auf Fett und Granulose und läßt sich in den Vakuolen der lebenden Bakterien nicht nachweisen. Es ist gewöhnlich in Einzahl vorhanden und im mittleren Teile der Zelle gelagert (Taf. III, 4 bis 13, Abb. 2, 3). Mitunter befinden sich die „Clitella" allerdings nicht in der Mitte des Stäbchens, sondern sind eher endständig. Ausnahmsweise können in sehr stark gestreckten Stäbchen zwei bis drei „Clitella" (Taf. III, 14) vorhanden sein. Diese Gebilde haben große Ähnlichkeit mit der „bande", wie sie von *Thomas* für *Bac. Calmettei* beschrieben worden ist. Wir kommen noch im weiteren darauf zurück; einstweilen wollen wir die Vermutung *Thomas'* bezüglich der Mit-



Abb. 2.

beteiligung besagter Gebilde an der Sporenbildung besprechen. Der genannte Verfasser schreibt folgendes: „Pendant cette évolution, les zones chromophiles deviennent de moins en moins importantes comme si elles se vidaient au profit de la spore.“ In Anbetracht dessen haben wir besondere Aufmerksamkeit den Dimensionen der „Clitella“ in verschiedenen Stadien der Sporenbildung geschenkt. Wie bereits erwahnt, ist die Lange der Clitella dem Querdurchmesser der Zelle gleich, während ihre Breite verschieden ist und zwischen 0,2 und 0,4 μ schwankt. Diese Schwankungen lassen sich bei unserem Objekte (*Gr. pectinovorum*) jedoch nicht mit der Sporenbildung in Beziehung bringen, zumal des öfteren die Stabchen. die eine völlig reife Spore enthalten, ein Clitellum fuhren, das (Taf. III, 11 bis 14, Abb. 2) ebenso breit ist wie das einer Zelle in den allerersten Stadien der Sporenbildung (Taf. III, 4 bis 7).



Abb. 3.

Woraus bestehen diese „Clitella“? Es kann sich nur um Chromatin und Metachromatin handeln, zumal es nicht gelungen ist Fett, Glykogen oder Granulose in ihnen aufzufinden. Zwecks Klärung dieser Frage wurde eine wasserige Aufschwemmung der Zellen 10 Minuten lang gekocht. Bei nachfolgender Behandlung mit Eisenhämatoxylin farbten sich die Clitella wie gewohnlich; ihre Dimensionen hatten sich nicht verringert. In mit Methylenblau gefarbten Präparaten entfärbten sich die Clitella bei nachfolgender Behandlung mit 1 %iger Schwefelsäure sehr rasch, wogegen sie bei Einwirkung einer 5 %igen Sodalösung ihre Farbung behielten. Bei Anwendung der sogenannten Vitalfärbung mit einer 1 : 10000 Neutralrotlösung konnten wir eine Ausfallung einzelner Metachromatinkörner in den Vakuolen, wie dies in den Vakuolen der Hefen und im Mycel anderer Pilze geschieht, nicht beobachten. Neutralrot fuhrt erst nach längerer Einwirkung zur Färbung der „Clitella“, nämlich dann, wenn die toxische Wirkung des Farbstoffes eintritt und die Zelle im Absterben ist. Gewöhnlich aber vermag das im Solzustande in den Vakuolen enthaltene Metachromatin leicht in den Gelzustand überzugehen, und es kommt auch öfters vor, daß es in Körnerform in den Vakuolen auch ohne Anwendung von „Vitalfärbung“ auftritt. Diese Ergebnisse, sowie die Untersuchungen, die mit Anwendung von *Feulgen*s Reaktion unternommen wurden. und von denen weiter

die Rede sein wird, gestatten es, die Clitella als chromophile, aus Chromatin bestehende Gebilde zu deuten.

Kehren wir nun zur Sporenbildung zurück. Wie bereits erwähnt, wird das ovale Körnchen, das im Stäbchen endständig liegt, allmählich größer. Wenn es seine maximale Größe erreicht hat, ist es von länglich-ovaler Form (Taf. III, 4 bis 10). Darauf nimmt die Länge der Prospore ab, der Querdurchmesser wird etwas größer, die Fähigkeit, Farbe aufzunehmen, wird geringer. Mit Ausbildung der Hülle und völligem Einbüßen der Färbbarkeit wird die Sporenbildung abgeschlossen (Taf. III, 11 bis 14). Bisweilen sind die Sporen von einem Ring von Cytoplasma, das intensiver Farbe aufnimmt, umgeben. Körnchen haben sich in den reifen Sporen bei der Färbung nicht nachweisen lassen. In den wachsenden Sporen bekommt man manchmal ein Körnchen zu sehen; es weist schwache Färbung auf und tritt darum nicht immer klar hervor. Im jungen, der Spore entschlüpften, spindelförmigen Stäbchen liegt ein klar hervortretendes rundliches Gebilde von 0,4 μ Durchmesser (Taf. III, 15). Der Teilung des Stäbchens geht Teilung dieses Gebildes voraus, in jungen Stäbchen ist je ein halbkugelförmiges oder ovales Körnchen enthalten, das der entstandenen Scheidewand beinahe fest anliegt (Taf. III, 16).

Bei Erforschung des Baues von *Gr. pectinovorum* ist den knospenbildenden Zellen besondere Aufmerksamkeit geschenkt worden. In gefarbten Präparaten wie auch beim Beobachten im lebenden Zustande werden Knospen nicht an jungen, sondern an alteren (gestreckten und verdickten) Zellen vorgefunden. Bei diesen ist die Chromatinsubstanz an zwei Punkten konzentriert: am Ende des Stabchens, wo sie als ovales Körnchen auftritt, und ferner im Zentrum der Zelle, wo sie eine Anhäufung bildet, die das Bild der oben beschriebenen „Clitella" (Taf. III, 17 bis 20) ergibt. Mithin haben die Umgestaltung der äußeren Form des Stäbchens und die Verteilung des Chromatins in ihm sowohl in den Zellen, die später Knospen liefern, wie auch in den sporenbildenden Zellen gleichartigen Verlauf. Ist in der Zelle Ausbildung des Polkörnchens und der „Clitella" erfolgt, so kann der weitere Vorgang in zwei Richtungen verlaufen: es findet Sporenbildung statt, oder es kann zum Entstehen von Knospen kommen. Im ersten Falle wird das in der Zelle terminal gelagerte sporogene Körnchen allmählich größer, das Stäbchen nimmt die typische „keulenförmige" Gestalt an, es wird eine Prospore und im weiteren ein reifes Plektridium gebildet. Im zweiten Falle stülpt das Polarkörnchen die Membran hervor und bildet eine Knospe. Auf Präparaten, die mit Eisenhämatoxylin gefärbt wurden, sind die Knospen oval oder rundlich; in verschiedenen Stadien der Knospung (Taf. III, 17 bis 2, Abb. 2, 3) verhalten sie sich der Mutterzelle gegenüber höchst eigenartig.

Die Knospen ergeben keine Reaktion auf Granulose und Fett. Die gute Färbbarkeit der Knospen spricht anscheinend dafür, daß diesen Gebilden eine besondere Membran fehlt. Bei Anwendung der oben beschriebenen Methode der *Feulgen*-Reaktion auf Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure haben wir feststellen können, daß sie positiv ausfällt, und daß ihr diffuser Charakter zukommt. Größere Zellanhäufungen werden in einem violetten, leicht ins Rötliche schlagenden Ton gefärbt, der schon mit bloßem Auge zu erkennen ist. Junge, einzeln gelagerte Zellen nehmen diffuse, und zwar sehr schwache, Färbung an. Bei älteren Formen, die Übergangsformen zur Sporenbildung (bzw. Knospenbildung) darstellen, wird ebenfalls die ganze Zelle durchfärbt, m. a. W. es lassen sich sowohl das Plasma wie auch die Körnelung nach *Feulgen* färben. Die Körnchen werden jedoch stets stärker als das Plasma gefärbt und nehmen dabei einen violetten Farbton an (Taf. III, 21). In den Stäbchen, die ein polar gelagertes Körnchen besitzen, zeigt dieses deutlich positive Reaktion. Zusammen mit dem Größerwerden des polar gelagerten Körnchens läßt sich das Cytoplasma der Zelle immer schwächer färben (Taf. III, 22), und zur Zeit der Ausbildung des „Clitellum", das immer eine positive *Feulgen*-Reaktion aufweist, färbt sich das Protoplasma fast gar nicht mehr (Taf. III, 23 bis 25). Ohne Hydrolyse fiel die Reaktion immer negativ aus, was einerseits die Richtigkeit des Verlaufs der Reaktionen, die dieser Methode zugrunde liegen, bestätigt und andererseits die Möglichkeit irrtümlicher von der nachfolgenden Behandlung abhängender Befunde ausschließt.

In der aus dem Polkörnchen entstandenen Prospore läßt sich lediglich der Zentralteil in Gestalt eines Körnchens färben, wobei die Form des Körnchens der Konfiguration der Prospore entspricht (Taf. III, 24 bis 25). Eine völlig reife Spore zeigt negative Reaktion. Durch Behandlung der Sporen mit Pikrinsäure oder durch stärkeres Erhitzen (15 Minuten auf 170^0) versuchten wir die Sporenhülle für fuchsinschweflige Säure permeabel zu machen; jedoch blieb der Sporeninhalt auch bei derartiger Behandlung ungefärbt. In der Knospe nimmt das Körnchen einen violetten Ton an und weist dabei geringere Größe auf als bei Hämatoxylinfärbung (Taf. III, 26 bis 28).

Vergleicht man die Größe der Chromatinkörnchen der Prospore, wie sie bei Eisenhämatoxylinfärbung auftreten, mit der denselben Gebilden bei Anwendung der *Feulgen*-Reaktion zukommenden Größe, so erweisen sich diese Gebilde im zweiten Falle als kleiner. Dies dürfte nicht allein durch Schwellung des Körnchens bei Eisenhämatoxylinfärbung bedingt sein. Zur Klärung dieser Frage haben wir unsere Untersuchungen auf andere sporenbildende Bakterien ausgedehnt.

Eine der Besonderheiten des von uns untersuchten Mikroorganismus besteht darin, daß er Granulose enthält, die bei Behandlung mit Jod Blaufärbung ergibt. Durch Ausführen der Reaktion an nichtfixierten und an fixierten Präparaten haben wir die Veränderungen während der Entwicklung des *Gr. pectinovorum* verfolgen können. Junge Zellen ergeben niemals eine Reaktion (Taf. III, 29). Speicherung der Granulose stellt sich erst ein, wenn die Stäbchen sich anschicken, länger und dicker zu werden. Sie tritt in Gestalt bläulich grauer Körnchen verschiedener Größe auf, die in der Zelle zerstreut liegen (Taf. III, 30 bis 32)[1]. Die Körnchen werden allmählich größer; sie können miteinander verschmelzen; dann wird das entsprechende Segment der Zelle völlig gefärbt (Taf. III, 33 bis 34). Aber selbst bei den Zellen mit etwas aufgeblasenem Ende, was auf Beginn der Sporenbildung hinweist, ist meistens keine homogene Färbung der gesamten Zelle vorhanden. Nur im Stadium der typischen Plektridien wird fast die ganze Zelle gefärbt. Wir sagen „fast", weil die Prospore und Spore sowie auch die in der Mitte der Zelle sich befindenden „Clitella" nie eine Reaktion auf Granulose ergeben (Taf. III, 36). Das ungefärbt bleibende, dem „Clitellum" entsprechende, helle Gebiet nimmt immer die ganze Breite der Zelle ein (Taf. III, 35, 36). Auch die im Stäbchen terminal entstehenden Knospen enthalten keine Granulose (Taf. III, 35). In den beim Freiwerden der Spore der Autolyse anheimfallenden Zellen lassen sich einzelne mit Jod färbbare Körnchen nachweisen (Taf. III, 37).

Ziemlich oft nahmen die Zellen des *Gr. pectinovorum* bei Färbung nicht einen bläulich grauen, sondern einen braunen Ton an, es trat also die für Glykogen typische Reaktion ein. Wir wissen nicht, wie diese Erscheinung zu deuten ist, da sie in Kulturen beobachtet wurde, die unter den gleichen Bedingungen und auf gleichem Nährboden gezüchtet waren.

Metachromatin wurde als kleines Körnchen, jedoch bei weitem nicht in jeder Zelle, vorgefunden. Reaktionen auf Fett zeigten, daß dieses in den Zellen in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Der Umstand, daß die Stäbchen des *Gr. pectinovorum* arm an solchen Stoffen wie Fett und Metachromatin sind, dürfte wohl mit dem bedeutenden Reichtum der Zellen an Granulose zusammenhängen, die den Hauptreservenährstoff darzustellen scheint.

Die Geißelfärbung hat ergeben, daß *Gr. pectinovorum* peritrich begeißelt ist; dies ließ die Beobachtung der Bewegung der Bakterien im Hängetropfen vermuten. Die Geißeln sind nicht zahlreich; sie erreichen eine Länge von 6 bis 7 μ, sind über die ganze Zelloberfläche

[1] Vgl. die Anwendung auf S. 464.

zerstreut und werden nur bei jungen Formen vorgefunden (Taf. II, 38). Bei den ein sporogenes Körnchen führenden Stäbchen lassen sich Geißeln nicht nachweisen.

Einfluß der Stoffwechselprodukte auf die Morphologie der Zelle.

Nachdem wir die „normale“ Morphologie der Zellen des *Gr. pectinovorum* auf den von uns gewählten Nährboden untersucht hatten, suchten wir die Fähigkeit dieser Formen zur Modifikation unter dem Einfluß gewisser Faktoren zu erforschen. Es war dabei von Interesse, die durch die Einwirkung eigener Umsetzungsprodukte bewirkten Veränderungen zu verfolgen. Solche Stoffe können, wie es *Nadson* und *Adamowitsch* erwiesen haben, bedeutende Veränderungen in den morphologischen und kulturellen Eigenschaften der Bakterien bewirken. Wir vermuteten, daß die Klarlegung des Autointoxikationseffektes uns zu der Deutung des Auftretens gewisser, in älteren Kulturen vorkommender Formen verhelfen würde. Wir führen hier die Untersuchungsmethode an.

Kolben mit K/S wurden mit *Gr. pectinovorum* beimpft und im Thermostaten bei 35° 8 bis 11 Tage lang bebrütet. Dann wurde der Kolbeninhalt durch *Chamberland*-Kerze L_3 filtriert und das Filtrat in verschiedenen Mengen in K/S enthaltende Reagensgläser gebracht. Das Filtrat war ganz klar; sein p_H betrug 5,6 bis 5,8. Es wurden die Zeit des Beginns der Gärung in den mit *Gr. pectinovorum* beimpften Reagensgläsern registriert und die Formveränderungen der in Entwicklung begriffenen Bakterien beobachtet.

Eine Zugabe von 3 bzw. 5 ccm des Filtrats zu 10 ccm K/S bewirkt ein im Vergleich zur Kontrolle um 15 bis 25 Stunden späteres Eintreten der Gärung, beeinflußt aber in keiner Weise die Morphologie der Stäbchen, die in üblicher Weise alle Etappen ihrer Entwicklung durchmachen.

Größere Mengen des Filtrats (10 ccm auf 5 ccm K/S) führen zu einer noch erheblicheren Hemmung der Gärung, und es treten dabei verschieden stark gekrümmte Stäbchen auf, die den in alten Kulturen vorgefundenen Formen gleichen. Vorwiegend kommen gekrümmte Plektridien vor, aber auch gekrümmte Fäden und Zellenketten werden gleichzeitig angetroffen.

Bei Hinzufügen von 9 ccm des Filtrats in ein Reagensglas, das Kartoffelstückchen mit 1 ccm einer 1 %igen Glucoselösung enthielt, beobachteten wir gleichzeitiges Auftreten von gekrümmten Formen und großen Plektridien, die $0{,}9$—$1{,}1 \times 16$—$25\ \mu$ maßen (Taf. II, 24).

Ein derartiges, in gewöhnlichen Kulturen seltenes Auftreten von „Gigantismus“ hängt anscheinend von einer pathologischen Stimulierung ab, welche durch auf Bakterien toxisch wirkende Stoffwechselprodukte hervorgerufen wird. Auch *Philippow* hatte bei Versuchen

an *Phycomyces nitens* unter dem Einfluß von Stoffwechselprodukten das Auftreten von Formen festgestellt, die größer als gewöhnlich waren.

Beimpfung des Filtrats, dem sterilisierte Kartoffelstückchen (ohne Glucoselösung) zugegeben worden sind, mit *Gr. pectinovorum* ergibt sehr spärliches Wachstum. Die Zellen treten in unbedeutender Menge auf. Im Filtrat ohne jede Zugabe fand gar kein Wachstum statt. Da wir nicht mit einzelnen im Filtrat vorkommenden chemischen Komponenten, sondern mit deren Gesamtheit arbeiteten, so sind wir nicht imstande zu sagen, welche unter den Stoffen, die das Filter passiert haben, diese Wirkung hervorbrachten. Jedenfalls kommt diese Rolle nicht den flüchtigen Verbindungen zu, da ein 10 Minuten lang gekochtes Filtrat gleiche Wirkung hat.

Gemeinsames Kultivieren von Gr. pectinovorum mit anderen Bakterien.

In diesen Versuchen verfolgten wir die Veränderungen von Zellen des *Gr. pectinovorum*, wenn das Bakterium zusammen mit anderen Mikroorganismen wuchs. Dann wurden gleichzeitig K/S enthaltende Reagensgläser mit *Gr. pectinovorum* und *Bac. mesentericus var. ruber* beimpft. Das Wachstum des *Gr. pectinovorum* wurde dabei nicht gehemmt, Gärung trat wie gewöhnlich ein, aber die Form der Zelle erfuhr gewisse Veränderungen. Im großen und ganzen ließen sich diese darauf zurückführen, daß an einem Ende der Zelle zu Beginn der Sporenbildung an Stelle der üblichen „keulenförmigen" Verdickung kugel- oder zitronenartige Anschwellungen auftraten, die im Durchmesser eine Größe von 2,5 bis 3,4 μ erreichten (Taf. II, 25). Das Stäbchen selbst, an dessen Ende eine derartige Anschwellung entstand, war kürzer und dünner, als es gewöhnlich der Fall ist. Gleichzeitig mit diesen Formen ließen sich in den Kulturen Stäbchen nachweisen, die in der Mitte eine Einschnürung oder umgekehrt eine Anschwellung besaßen, und daneben traten noch deformierte kurze Stäbchen auf (Taf. II, 25). Ein Auftreten dieser atypischen Formen wurde immer in 24 Stunden alten Kulturen bei gemeinsamem Bebrüten mit *Bac. mesentericus* beobachtet. Die Zellen des letztgenannten vermehrten sich stark und behielten dabei ihre übliche Form bei. Im übrigen verliefen bei *Gr. pectinovorum* Sporenbildung und Entstehen von Knospen in gewöhnlicher Weise. Es sei vermerkt, daß durch eigene Stoffwechselprodukte eine derartige terminale Anschwellung nicht hervorgerufen wird. Durch gemeinsames Kultivieren von *Gr. pectinovorum* mit *Bact. fluorescens liquefaciens* sind weder Entwicklung noch Morphologie der *Gr. pectinovorum*-Zellen beeinflußt worden.

Deutung der Befunde.

Die ausgeführten Untersuchungen haben erwiesen, daß die *Gr. pectinovorum*-Zellen nicht allein durch Querteilung, sondern auch durch Knospung sich vermehren können. Knospenbildung wird an älteren Zellen beobachtet, die bereits das Vermögen, sich durch Teilung zu vermehren, eingebüßt haben. Die cytologischen Untersuchungen haben erwiesen, daß die Knospen durch Heraustreten des in der Zelle polar gelagerten Chromatinkörnchens gebildet werden, welches in den Anfangsstadien der Sporenbildung sichtbar ist. Die Knospe entsteht aus dem Körnchen, das dabei die Membran hervorstülpt und sich später von der Mutterzelle loslöst. Der Mechanismus der Entstehung und die polare Lagerung der Knospen sowie auch die völlige Analogie der morphologischen, dem Auftreten von Knospen bzw. Sporen vorangehenden Veränderungen gestatten, die Sporen- und Knospenbildung in Parallele zueinander zu stellen. In einer bestimmten Phase der Entwicklung sind die Zellen imstande, die kleine Sporenanlage, die in den meisten Zellen zu einer Spore wird, zu „entfernen". Diese Erscheinung besitzt wohl den Charakter einer Anpassung und widerspricht nicht der Vorstellung, die Bakterien seien Wesen, deren Entwicklung kompliziert und vielfältig ist. Gegenwärtig vermögen wir nur die Vermutung auszusprechen, daß Sporenbildung eine vollkommenere Anpassung darstellt als Ausbildung von Knospen, und daß diese der Sporenbildung vorangegangen ist. Es darf gewiß auch die Möglichkeit nicht außer acht gelassen werden, daß bei verschiedenen Bakterien die reproduktiven Gebilde verschiedenartig sein können oder nur bei der einen Form und nicht bei anderen vorkommen. Augenscheinlich darf ein einheitliches Schema für die Entwicklungsgeschichte sämtlicher Bakterien nicht aufgestellt werden.

Die ausgebildeten und frei gewordenen Knospen vermögen ihre Dimensionen, und zwar ihren Längendurchmesser, zu vergrößern und sich dabei in gewöhnliche vegetative Zellen zu verwandeln. Knospenbildung ist auch in alteren Kulturen möglich, nur findet hier ein Auskeimen der Knospung nicht statt; diese verbleiben in der Kultur und behalten dabei ihre übliche Gestalt bei. Die frei gewordenen Knospen sind einer selbständigen Vermehrung nicht fähig; sie erfahren weder Teilung noch Knospung. Somit stellen die Knospen eine der Phasen der individuellen Entwicklung, nicht aber eine besondere Existenzform des Mikroorganismus vor, die einer weiteren Vermehrung fähig wäre. Sonst hätten wir eine aus Stäbchen und Kokken bestehende Kultur vor uns, was in der Tat nicht der Fall war. In den Kulturen konnten freie Knospen in Gestalt kleiner lichtbrechender Gebilde nur dann nachgewiesen werden, wenn knospenbildende Zellen in den Kulturen in

beträchtlicher Menge vorkamen. Im Laufe unserer 14monatlichen Untersuchungen haben wir kein einziges Mal einen Stamm erhalten, der aus kokkenartigen Formen bestände. In Anbetracht dessen kann bei *Gr. pectinovorum* von einem Dimorphismus im Sinne *Kuhns* und *Sternbergs* nicht die Rede sein.

Wenn wir die *Gr. pectinovorum*-Kulturen durch die *Chamberland*-Kerze filtrierten und mit dem Filtrate Impfungen vornahmen, so erhielten wir Wachstum dieses Bakteriums. Das Vorkommen von filtrierbaren Formen ist für pathogene und saprophyte Bakterien mehrmals festgestellt worden. In unseren Versuchen trat bei Beimpfung mit dem Filtrat Wachstum des *Gr. pectinovorum* am zweiten bis dritten Tage ein; die dabei entstehenden Stäbchen waren morphologisch von den in gewöhnlichen Kulturen vorkommenden nicht verschieden. Dieses Wachstum mag dadurch bedingt sein, daß unsichtbare Formen den Filter passieren, die die Fähigkeit besitzen, eine aus Stäbchen bestehende Kultur zu ergeben. Aber auch eine andere Deutung ist möglich. Da die Größe der Knospen nicht gleichartig ist, so müssen wohl in der Kultur Gebilde von sehr geringen Dimensionen enthalten sein, die das Filter zu passieren und Wachstum zu ergeben vermögen. Die zweite Deutung scheint die richtigere zu sein, da die Kulturen sich sehr früh (am zweiten bis dritten Tage) entwickeln und die positiven Ergebnisse weder vom Alter der filtrierten Kultur noch von der Zahl der ausgeführten Filtrationen abhing.

Die Ergebnisse unserer cytologischen Untersuchungen müssen im Lichte des gegenwärtigen Standes des Problems vom Vorkommen eines Kernes bei Bakterien betrachtet werden. Es ist jedoch nicht unsere Aufgabe, in die Besprechung der Literatur über eine der umstrittensten Fragen der Mikrobiologie einzugehen. Wir wollen nur darauf hinweisen, daß die Anwendung der *Feulgen*-Reaktion eine Reihe interessanter Befunde ergeben hat (*Voit*, *Cuhna* und *Muniz*, *Neumann*, *Thomas*, *Stapp* und *Bortels*, *Pokrowskaja*, *Kuhn* und *Sternberg*, *Pietschmann* und *Rippel* u. a.). Diese neue Methode darf jedoch nicht eine Revision der früheren klassisch gewordenen, auf dem Wege der üblichen Färbungsmethoden ermittelten Befunde verursachen, und ebenso wenig darf sie ein Gegenüberstellen der chemischen Auffassung des Kernes dem entsprechenden morphologischen Begriff gestatten. Für die Ermittlung der Natur verschiedener in der Zelle vorkommender Körnchen stellt diese mikrochemische Reaktion ein wertvolles Kriterium vor, und sie sollte demnach als unumgängliche Ergänzung bei der Erforschung der Bakterienstruktur benutzt werden.

Bei *Granulobacter pectinovorum* ist die Ausbildung einer Vakuole am Verschmelzungspunkt der Chromatinkörnchen von erheblicher Bedeutung. Wir sind nicht geneigt, diese Verschmelzung als eine

der Sporenbildung vorangehende Autogamie zu deuten, zumal zur Zeit des Zusammenkommens der Körnchen das im Stäbchen gelagerte sporogene Körnchen bereits vorhanden ist. Der Umstand, daß die Clitella in den mit einer reifen Spore behafteten Zellen völlig erhalten bleiben, gestattet es, diese Gebilde als Chromatin aufzufassen, das bei Sporenbildung unausgenutzt in der Zelle zurückgeblieben ist. Wie bereits mehrfach hervorgehoben wurde, bleiben nämlich bei der Sporenbildung manchmal größere Mengen Chromatinsubstanz in der Zelle zurück (*Swellengrebel*, *Mattes*).

Zu etwas anderen Schlüssen ist *Thomas* (1932) bei seinen Beobachtungen an *Bac. Calmettei* gelangt. Er meint, daß die bei diesen Bakterien vorgefundenen quer gelagerten chromophilen Zonen eine Kondensation verschiedener Stoffe darstellen, von Nucleinen, Metachromatin und Glykogen oder einem Glykoproteinkomplex. Diese Zonen, die einige Bestandteile des Cytoplasmas enthalten, seien in physiologischer Hinsicht höchst aktiv und stellten ein Äquivalent des Kernes vor. Wir haben oben darauf hingewiesen, daß bei *Granulobacter pectinovorum* mit dem Größerwerden der Prospore die Dimensionen der chromophilen Zonen nicht abnehmen, d. h. daß sie, entgegen der Behauptung *Thomas'*, bei der Sporenbildung nicht verbraucht werden. Es scheint, daß dies auch bei *Bac. Calmettei* nicht selten der Fall ist, da auf den Abbildungen bei *Thomas* Zellen dargestellt sind, die zu gleicher Zeit Prosporen von bedeutender Größe und sehr breite Clitella führen (Abb. 6, 8, 20 u. a.). Die Mechanik der Ausbildung der chromophilen Zonen wird in der Arbeit von *Thomas* nicht berücksichtigt. In den meisten seiner Abbildungen sind vollständig ausgebildete quergelagerte Clitella dargestellt. Gemäß den Abb. 33, 34, 35 sind in jüngeren Zellen nach *Feulgen* sich färbende Granula enthalten, die im Cytoplasma diffus verteilt sind. Es wäre von höchstem Werte, festzustellen, inwiefern diese Körnchen an der Ausbildung der chromophilen Zonen beteiligt sind, d. h. die Dynamik des besagten Prozesses zu erforschen. Wir sind keineswegs geneigt, die chromophilen Zonen von *Gr. pectinovorum* mit solchen von *Bac. Calmettei* zu identifizieren, zumal wir dazu keinen Grund haben. Wir haben es jedoch für nötig befunden, die Arbeit *Thomas'* näher zu besprechen, da die Morphologie der besagten Clitella mit den von uns erforschten chromophilen Zonen vieles gemein hat.

Die cytologischen Untersuchungen haben erwiesen, daß bei dem Flachsröstebakterium die Chromatinsubstanz keine Struktur besitzt, die für sämtliche Phasen ihrer individuellen Entwicklung stabil wäre. Es kann in den Zellen entweder multiple Körnelung oder ein einzelnes, größeres kompaktes, kernähnliches Gebilde vorkommen. Es lassen sich also sowohl Bilder beobachten, die die Anschauung bestätigen, es käme den Bakterien ein chromidiales System zu, wie auch Bilder, die

in vollem Maße mit dem Befunde eines Kernes bei den Bakterien übereinstimmen.

Das Chromatin vermag seine Lage in der Zelle zu wechseln sowie auch seine Masse an einem Punkte zu vermindern und am anderen zu vergrößern. Diese Labilität, das Vermögen, verschiedenartige Strukturen in der Zelle hervorzubringen, gestattet es, die Vermutung auszusprechen, daß die Wanderung der Chromatinsubstanz durch den Ortswechsel unsichtbarer Partikelchen bedingt sein kann. Anderenfalls ließe es sich schwer erklaren, auf welche Weise das Größerwerden des Polkörnchens ohne sichtbare Annaherung von Chromatinkörnchen und Verschmelzung mit ihm zustande kommt, und auch wodurch die blassere *Feulgen*-Färbung des Cytoplasmas der Zelle hervorgerufen wird.

Schlußfolgerungen.

1. Die Entwicklungsgeschichte des *Granulobacter pectinovorum* besteht aus folgenden Phasen: junge, bewegliche, durch Teilung sich vermehrende Stabchen gehen in dickere, unbewegliche Gebilde uber, die lediglich in ihrem angeschwollenen Ende eine Spore entstehen lassen. Bei nachfolgendem Zugrundegehen des Stäbchens wird die Spore befreit. Der aus der Spore hervorkeimenden Zelle kommt nicht Stäbchen-, sondern Spindelform zu.

2. Zellen von *Gr. pectinovorum* vermögen sich durch Knospen zu vermehren, die in Einzahl endstandig in den dickeren Stabchen entstehen. Von der Mutterzelle abgelöst, können die Knospen als solche sich nicht vermehren, sondern sie erfahren eine direkte Verwandlung in Stabchen. Die Knospen lassen sich mit Kernfarbstoffen farben und ergeben eine positive *Feulgen*-Reaktion.

3. Verschiedenartig geschlangelte Formen entstehen in den Kulturen infolge der Einwirkung der im Medium sich anhaufenden Stoffwechselprodukte. Es sind Involutionsformen, die spater zugrunde gehen.

4. Durch Filtration von *Gr. pectinovorum*-Kulturen wurde das Bestehen filtrierbarer Formen festgestellt.

5. Junge Zellen gehen bei 53° binnen 5 Minuten und bei 50° binnen 10 Minuten zugrunde. Die Sporen werden durch eine Temperatur von 85° binnen 10 Minuten und von 100° binnen 3 Minuten getötet.

6. Die Chromatinsubstanz der aus Sporen entstandenen Stäbchen ergibt ein streng umschriebenes kompaktes Gebilde. In jungen vegetativen Zellen tritt das Chromatin in Körnchengestalt auf. Die Formen, die sich im Stadium der Sporenbildung und der Bildung von Knospen befinden, besitzen in der Mitte der Zelle eine Vakuole, die ein chromophiles, den ganzen Querdurchmesser der Zelle einnehmendes Gebilde

enthält. Diese „Clitella“ sind von Chromatin gebildet und bleiben auch in den Zellen bestehen, die eine völlig reife Spore enthalten.

7. Bei der *Feulgen*-Reaktion färben sich die Zellen diffus, aber in verschiedenen Entwicklungsphasen des Mikroorganismus ist die Färbung nicht gleichartig. Die Chromatinkörnchen nehmen intensiv Farbe auf.

8. Junge Zellen enthalten keine Granulose. Diese tritt in älteren Zellen in Form einzelner, später zusammenfließender Körnchen auf. In Prosporen, Sporen, Knospen und „Clitella“ ist Granulose nicht vorhanden.

Literatur.

1) *Almquist, E.*, J. of Inf. Dis. **31**, 483—493, 1922. — 2) *Derselbe*, Biologische Forschung über die Bakterien. Stockholm 1925.

3) *Batschinskaja, A.*, Bull. l'Acad. Sc. de l'URSS., Nr. 8, S. 1189—1204, 1933. — 4) *Behrens, J.*, Centralbl. f. Bakt. II, **8**, 114, 1902. — 5) *Derselbe*, *F. Lafars* Handb. d. techn Mycol. **3**, 269. — 6) *Beijerinck, M.*, u. *A. van Delden*, Verzamelde Geschriften van *M. W. Beijerinck*, Deel 4, p. 212—228. Delft 1921. — 7) *Bergey, D.*, Manual of Determinative Bacteriology, 3rh ed. Baltimore 1930. — 8) *Bredemann, G*, Centralbl. f. Bakt. II, **23**, 385—568, 1909.

9) *Cuhna, A.* u. *J. Muniz*, C. r. Soc. Biol. **100**, 951—954, 1929. — 10) *Cunningham, A.*, Centralbl. f. Bakt. II, **83**, 22, 1931.

11) *den Dooren de Jong*, diese Zeitschr. **4**, 36—53, 1933.

12) *Enderlein, G.*, Bakterien-Cyclogenie. Berlin und Leipzig 1925.

13) *Guilliermond, A.*, Arch. f. Protist. **12**, 9—43, 1908.

14) *Hadley, Ph.*, J. of Infect. Dis. **40**, 1—312, 1927.

15) *Imšenecki, A.*, Arch. Sciences Biol. (russ.), im Druck. — 16) *Issatschenko, B.* u. *A. Wackenhut*, ebenda **32**, 484—490, 1932 (russ.).

17) *Knaysi, G.*, J. Bact. **26**, 623—644, 1933. — 18) *Krassilnikow, N.*, J. de Microbiol. **12**, 16—30, 1931 (russ.) — 19) *Krzemieniewska, H.*, Acta Soc. Bot Polon. **7**, 507—519, 1930. — 20) *Derselbe*, diese Zeitschr. **4**, 394—408, 1933. — 21) *Kudrjawzew, W.*, Bull. l'Acad. Sc. de l'URSS. Nr. 9, p. 1301—1327, 1932 (russ). — 22) *Kuhn, Ph.* u. *K. Sternberg*, Centralbl. f. Bakt., I. Orig., **121**, 113—161.

23) *Lewis, J.*, J. Bact. **24**, 381—414, 1932. — 24) *Lohnis, F.*, Mem. Nat. Ac. Sci. **16**, 1—252, 1922.

25) *Mattes, O.*, Sitzungsber. d. Ges. z. Beford. d. ges. Naturwiss. Marburg **62**, 381—417, 1927. — 26) *Meyer, A.*, Die Zelle der Bakterien. Jena 1912. —

27) *Nadson, G.* u. *S. Adamowitsch*, Bull. Jardin Botanique de St. Pétersbourg **10**, 154—165, 1910 (russ.). — 28) *Neumann, F.*, Berl. tierärztl. Wochenschrift, Nr. 7, S. 101—102, 1930. — 29) *Nyberg, C.*, Soc. Sci. Fenn. Comment. Biol. **3**, Nr. 7, 1—22, 1928.

30) *Oesterle, P.* u. *C. Stahl*, Centralbl. f. Bakt. II, **79**, 1—25, 1930.

31) *Petschenko, B.*, Bull. intern. de l'Acad. polon. de Sci. No. 2—7, 1929.

— 32) *Philippow, G.*, Annal. Röntg. et Radiol., No. 1—2, p. 3—95, 1933 (russ.). — 33) *Pietschmann, K.* u. *A. Rippel*, diese Zeitschr. 3, 422—452, 1932. — 34) *Pokrowskaja, M.*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig., 119, 353—361, 1931.

35) *Regel, S. de*, ebenda II, 86, 44—68. — 36) *Rochlina, E.*, Bull. l'Acad. Sc. de l'URSS. No. 6, p. 855—858, 1933 (russ.). — 37) *Rokitzkaja, A.*, Pedology, No. 3, p. 209—224, 1933 (russ.). — 38) *Rudakow, K.*, Mikrobiology 2, 57—62, 1933 (russ.). — 39) *Ruschmann, G.* u. *W. Bavendamm*, Centralbl. f. Bakt. II, 64, 340—394, 1925.

40) *Schussnig, B.*, ebenda I. Orig., 85, 1—12, 1920. — 41) *Stapp, C.* u. *Bortels*, Zeitschr. f. Parasiten. 4, 101, 1931. — 42) *Stapp, C.* u. *H. Zycha*, diese Zeitschr. 2, 493—536, 1931. — 43) *Störmer, K.*, Über die Wasserröste des Flachs. Inaug.-Diss. Jena 1904. — 44) *Stoughton, R.*, Proc. Roy. Soc. Ser. B, 105, 469—484, 1929. — 45) *Swellengrebel, N.*, Arch. f. Protist. 31, 277—285, 1913.

46) *Thomas, A.*, C. r. Soc. Biol. 105, 859—861, 1930. — 47) *Derselbe*, Arch. zool. expér. 72, 417—443, 1932.

48) *Voit, K.*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med., S. 564—568, 1927.

49) *Winogradsky, S.*, C. r. de l'Acad. d. Sc. Paris 121, 742—745, 1895.

Das Verhalten der auf grünen Pflanzen vorkommenden Coli- und coliähnlichen Bakterien gegenüber Säuren.

Von

G. Ruschmann (Landsberg, Warthe) und W. Meyer.

(Eingegangen am 2. Juni 1934.)

In einer vorangehenden Arbeit [*G. Ruschmann* und *W. Meyer* (26)] wurde über die Eigenschaften von *Coli-* und *coli*ähnlichen Bakterien berichtet, die von verschiedenem grünem Pflanzenmaterial isoliert worden waren; die Stämme wurden auf Grund der Ergebnisse zu den einzelnen *Coli-Aerogenes*-Gruppen gestellt. Unter der großen Zahl der Kulturen waren für jede Gruppe einige typische Vertreter ausgewählt und auf ihr Verhalten in reinem Wasser und auf eiweißarmen, zuckerreichen Nährböden untersucht worden. Ferner wurden diese Stämme zu einer Nachprüfung der von *C. Hüttig* (17, 18) mitgeteilten Ergebnisse benutzt, nach denen sich *Coli*-Bakterien durch Erhitzen einer Aufschwemmung in Streptokokken umwandeln sollten. Das Ergebnis der Versuche war trotz genauester Innehaltung der Technik negativ.

Im folgenden soll über Versuche berichtet werden, in denen das Verhalten dieser Stämme gegenüber verschiedenen organischen und anorganischen Säuren geprüft wurde. Die Untersuchungen erstreckten sich nicht allein auf die Frage, bis zu welchem p_H-Wert die Organismen noch wuchsen, sondern auch darauf, ob und in welchem Grade sich die Bakterien unter den gegebenen Bedingungen in morphologischer oder physiologischer Beziehung veränderten.

A. Verhalten von Coli- und coliähnlichen Bakterien in saurer Bouillon.

Zu den Versuchen über die Frage, ob sich die auf grünen Pflanzen vorkommenden *Coli-* oder *coli*ähnlichen Bakterien veränderten, wenn man sie längere Zeit in einem sauren Nährmedium züchtete, diente einfache Nährbouillon, die durch Zusatz verschiedener Säuren auf das gewünschte p_H gebracht wurde.

Die Wahl dieser Nährflüssigkeit wurde durch eine Angabe von *E. Speyer* (27) veranlaßt, wonach *Bact. coli* eine ungünstige saure Reaktion in Bouillon weit besser verträgt als in synthetischen Nährböden. Er benutzte zunächst die von *H. Braun* und *C. Cahn-Bronner* (5) angegebene Nährlösung, deren p_H-Wert er durch die Wahl des Phosphatgemisches innerhalb von 5,4 bis 7,5 veränderte. Höhere bzw. niedrigere Werte wurden durch Zugabe von H_3PO_4 oder NaOH erreicht. Zur Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration in der Bouillon verwendete *E. Speyer* ebenfalls Phosphorsäure oder Natronlauge.

Bei den folgenden Versuchen handelte es sich zuerst um die Feststellung, bei welchem p_H des Nährbodens die Stämme gerade noch

wuchsen, da für die weiteren Untersuchungen möglichst hohe Säuregrade benutzt werden sollten. Dann war es aber auch wichtig zu erfahren, ob die verschiedenen anorganischen oder organischen Säuren stets die gleichen Wirkungen auf die Organismen ausübten, oder ob hierbei größere Unterschiede auftraten. Die Versuche wurden aus diesem Grunde gleichzeitig mit Salzsäure, Phosphorsäure, Milchsäure, Essigsäure und Buttersäure angestellt. Dies sind die Säuren, die auch bei der Einsäuerung von Grünfutter die Hauptrolle spielen.

Genauere Untersuchungen über das Verhalten von *Bacterium coli* in salzsaurer Bouillon stammen von *K. Scheer* (28, 29), der als p_H-Grenze, bei der dieser Organismus noch wuchs, 4,7 feststellte. Dasselbe gilt nach diesem Autor für Milchzuckerbouillon, die mit HCl versetzt wird. Bei einem p_H von 4,6 wurde *B. coli* nach 24 Stunden und bei einem p_H von 3,2 bereits nach 3 Stunden abgetötet. In einer anderen Arbeit teilt *K. Scheer* (30) mit, daß *B. coli* in stark salzsaurer Bouillon gegenüber *Bact. typhi*, *paratyphi* und *Shiga-Kruse* die längste Lebensdauer zeigte. Über die Wasserstoffionenkonzentration der Bouillon werden jedoch keine genaueren Angaben gemacht.

Für einen von Gras isolierten Organismus, der nach Angabe des Autors zur *Herbicola*-Gruppe gehörte, gibt *K. Ishimori* (19) ebenfalls ein p_H von 4,7 als Wachstumsgrenze in salzsaurer Bouillon an. Im Gegensatz zu *K. Scheer* fanden *L. Michaelis* und *Marcora* (23), daß ein p_H von 5,0 in dieser Nährflüssigkeit den höchsten Aziditätsgrad darstellt, bei dem *B. coli* auf die Dauer noch bestehen kann. *Cluset*, *R. Rochaix* und *Kofman* (8), ferner *K. G. Dernby* (10) sowie *K. G. Dernby* und *C. Näslund* (11) kamen wieder zu etwas niedrigeren Werten. Ihnen gelang es, *B. coli* noch bei einem p_H von 4,5 bis 4,6 zu züchten.

Durch den Aufenthalt der Bakterien gerade in salzsaurer Bouillon sind Veränderungen an ihnen häufiger beobachtet worden. So konnte *H. Lotze* (22) dadurch Umwandlungen erhalten, daß er *B. typhi*, *paratyphi* und *coli*, die eine Zeitlang in schwach salzsaurer Bouillon gehalten worden waren, in schwach alkalische Bouillon übertrug. Unter 49 Versuchen dieser Art glückte es ihm, siebenmal eine stabile Umwandlung und viermal eine labile Modifikation zu erzielen. Die Umwandlungserscheinungen traten ausnahmslos im Anschluß an leichtere Reizwirkungen auf, während starke Reize entweder keinen Erfolg hatten oder die Abtötung der Organismen bewirkten. Der Autor kommt auf Grund dieser Ergebnisse zu dem Schluß, daß die Möglichkeit einer Überführung der pathogenen Form in eine saprophytische im Darm gegeben sei.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Phosphorsäure. Für diese gibt *E. Speyer* (27) einen p_H-Höchstwert von 4,5 an, bei dem *B. coli* in Bouillon noch lebensfähig bleibt. *R. P. Myers* (25) findet bei derselben Säure, ebenso wie *K. G. Dernby* (10), annähernd den gleichen Grenzwert. Ganz allgemein kommen *R. P. Cook* und *R. S. Alcock* (9) zu dem Schluß, daß in zunehmendem Maße eine Inaktivierung der Dehydrogenasen und der Oxydation von Succinaten, Lactaten und Formiaten durch *B. coli* eintritt, wenn die Reaktion des Nährmediums saurer wird. Die Autoren sprechen deshalb von einer Inaktivierung, weil sich die Fähigkeit des *B. coli*, Oxydationen hervorzurufen, wieder einstellt, sobald sich seine Lebensbedingungen günstiger gestalten.

Der Einfluß von Säuren und Salzen auf die Schwärmfähigkeit von Bakterien der *Typhus-Coli*-Gruppe auf festen Nährböden wurde von *V. Dimitrÿević-Speth* (13) untersucht, der beobachtete, daß eine Wachstumshemmung auf sauren Nährböden erst dann eintrat, wenn das Schwärmen völlig unterbunden war.

Etwas höhere p_H-Werte als für die bisher genannten Mineralsäuren konnte *K. Brünn* (6) für Milchsäure feststellen. Nach ihm wirkte diese Säure bzw. ihr Natriumsalz bei einem p_H von 4,7 innerhalb 24 Stunden bakterizid. In Milchzuckerbouillon, die mit Milchsäure angesäuert wurde, lag nach *K. Scheer* (29) die untere Wachstumsgrenze für *B. coli* bei p_H 5,3.

O. Gratz (16) fand bei seinen Untersuchungen über die Möglichkeit, die Entwicklung von *B. coli* zu unterdrücken, daß bei einem Gehalt von 0,4 % Milchsäure in Milchzuckerbouillon keinerlei Wachstum mehr eintrat. Bei einem Zusatz von 0,3 % Milchsäure ging nur die Fähigkeit des Organismus, aus Milchzucker Gas zu bilden, verloren, die bei Verwendung von 0,2 % Milchsäure noch vorhanden war. Bei der Einbuße dieser Eigenschaft handelte es sich allerdings mehr um eine augenblickliche Beeinflussung des Organismus als um eine endgültige Veränderung seiner Eigenschaften.

In diesem Zusammenhang seien noch die Versuche von *G. Abraham* (1) erwähnt, aus denen hervorgeht, daß sich *B. coli* nicht in Buttermilch entwickelt, weil ihr Säuregrad zu hoch liegt (25,0 bis 31,6° nach *Soxhlet-Henkel*).

In Widerspruch zu den bisher genannten Autoren, die alle ein p_H von 5,0 oder nur einen etwas tieferen Wert als Wachstumsgrenze für *B. coli* in milchsauren Nährmedien angeben, stehen die Ergebnisse von *D. Bach* (3), nach denen eine deutliche Vermehrung des Organismus in milchsaurer Bouillon noch bei einem p_H von 4,5 eintrat, ohne daß sich eine bakterizide Wirkung der Säure bemerkbar machte. Annähernd den gleichen Wert (p_H 4,6 bis 4,7) konnte *K. Ishimori* (19) bei einem *Herbicola*-Stamm in dieser Nährlösung erreichen. Nach *H. Braun* und *C. Cahn-Bronner* (5), die allerdings keine näheren Angaben über den Säuregrad machen, verträgt *B. coli* Milchsäure, Citronensäure und Bernsteinsäure in nicht zu starken Konzentrationen gut und verwertet sie sogar als Kohlenstoffquellen.

Da beim Wachstum von *B. coli* in zuckerhaltigen Nährböden Essigsäure und Milchsäure als Stoffwechselprodukte entstehen, haben einige Autoren Untersuchungen darüber angestellt, bis zu welchem p_H die Säurebildung in solchen Nährböden fortschreiten darf, ohne daß die Kultur abstirbt. In allen Fällen ergab sich, daß diese Grenze mit derjenigen zusammenfiel, die auch bei Ansäuerung von gewöhnlicher Bouillon mit einer dieser Säuren festgestellt wurde. So fanden z. B. *C. E. Cahn-Bronner* (7), *K. Scheer* (29), *L. Michaelis* und *Marcora* (23) sowie *K. Brünn* (6) für *B. coli* in dieser Hinsicht keinerlei Unterschiede. Das gleiche gibt *K. Ishimori* (19) für sein zur *Herbicola*-Gruppe gehörendes, von Gras isoliertes Bakterium an. Für die in Bierwürze vorkommenden Bakterien der *Coli-Aerogenes*-Gruppe stellte *M. Löweneck* (21) einen Säuerungsgrad in Würze fest, der je nach der Kultur etwas schwankte. Die Bakterien erzeugten p_H-Werte von 4,5 bis 4,8, bei denen sie aber noch lebensfähig blieben.

In Milchzuckerbouillon, die mit Essigsäure angesäuert worden war, vertrug *B. coli* nach *K. Scheer* (29) noch ein p_H von 5,0, ohne daß es dabei zugrunde ging. Die Angabe von *A. Adam* (2), daß sich dieser Organismus noch gut bei einem p_H von 6,4 in essigsaurer Bouillon entwickelt, ist nicht so aufzufassen, als ob der Wert die untere p_H-Grenze wäre.

I. Methodisches.

a) Herstellung der sauren Bouillon. Für die folgenden Versuche diente, wie schon erwähnt, einfache Bouillon, die durch Zugabe von verschiedenen Säuren auf das gewünschte p_H gebracht wurde. Dabei verfuhr man folgendermaßen: In je ein Reagenzglas mit 8 ccm Nährlösung wurde zunächst je 1 Tropfen der fünf konzentrierten Säuren gegeben und nach kräftigem Umschütteln auf kolorimetrischem Wege das p_H bestimmt. Dem gefundenen Säuregrad entsprechend wurden die Säuren so weit verdünnt, daß nunmehr durch Zusatz von 1 Tropfen Säure zur Bouillon in allen Fällen dasselbe p_H erreicht wurde. Dabei stellten sich folgende Konzentrationen als ungefähr gleich wirksam heraus: 5,0 % HCl, 20,6 % H_3PO_4, 10,0 % Milchsäure, 20,0 % Essigsäure und 22,0 % Buttersäure.

Mit diesen Säurelösungen wurde die Bouillon unter möglichst sterilen Bedingungen angesäuert. Dabei trat infolge von Eiweißfällungen eine Trübung der Bouillon ein. Diese war bis zu einem p_H von 6,0 noch so gering, daß sie kaum bemerkt werden konnte, wurde aber bei einem p_H von 5,5 schon etwas deutlicher und bei einem solchen von 5,0 sogar ziemlich stark. Sie nahm bei einem p_H von 4,5 noch zu. Die Unterschiede in der Trübung waren so deutlich, daß man sich dadurch ungefähr ein Urteil über den Säuregrad bilden konnte.

Nachdem die Bouillon auf den gewünschten p_H-Wert eingestellt und während 20 Minuten im Dampftopf erhitzt worden war, wurde sie so lange filtriert, bis sie völlig klar durchlief. Darauf wurde sie nach dem Abkühlen noch einmal auf ihren Säuregrad geprüft, der sich in einigen Fällen durch das Erhitzen merklich geändert hatte. Z. B. war der Wert von buttersaurer Bouillon von 4,0 auf 4,3, der von salzsaurer Bouillon von 6,0 auf 6,3 und der von phosphorsaurer Bouillon von 4,0 auf 4,2 gestiegen. In diesen Lösungen wurde das benötigte p_H durch Hinzugeben einer entsprechenden Menge Säure wieder hergestellt. Ein zweites kurzes Sterilisieren rief weder eine Trübung der verschiedenen Bouillonarten noch eine merkliche Veränderung der H-Ionenkonzentration hervor. Auch blieben die p_H-Werte, wie Kontrolluntersuchungen ergaben, während der ganzen Dauer der Versuche in allen Nährlösungen unverändert.

Die saure Bouillon wurde dann unter sterilen Maßnahmen in schmale Röhrchen abgefüllt, die eine Verdunstung im Brutschrank weitgehend einschränkten. Zur Erreichung der gleichen Schichthöhe wie in normal weiten Röhrchen mit 8 ccm Flüssigkeit genügten in diesem Falle 3 ccm. Das Abfüllen erfolgte mit einer sterilen Pipette, wodurch ein nochmaliges Sterilisieren der Bouillon vermieden wurde. Unbeimpfte Röhrchen zeigten auch nach 14tägiger Bebrütung bei 30° kein Wachstum. Gleichzeitig wurde an diesen Kontrollröhrchen festgestellt, daß trotz ihres längeren Aufenthaltes im Brutschrank eine Erhöhung der p_H-Werte bei den einzelnen Lösungen nicht eingetreten war.

b) Auswahl der Stämme. Zum Beimpfen der sauren Bouillon wurde eine Nadelspitze voll einer 24 Stunden alten Schrägagarkultur in 8 ccm sterilen Leitungswassers verrieben, so daß eine leichte Trübung des Wassers zu erkennen war. Von dieser Aufschwemmung kam eine stets gleichmäßig große Öse voll in die Bouillonröhrchen. In den Fällen, in denen die Kulturen nicht anwuchsen und Zweifel bestanden, ob die Impfung nicht zu schwach ausgefallen war, wurden die Röhrchen nach einigen Tagen in derselben

Stärke noch einmal beimpft. Doch ließen sich andere Ergebnisse nur erzielen, wenn die Impfung sehr verstärkt wurde.

Zunächst sollte, wie gesagt, das p_H festgestellt werden, bei dem die verschiedenen Stämme gerade noch wachsen konnten. Zu allen Versuchen wurden dieselben Organismen benutzt. Neben dem Laboratoriumsstamm *B. coli Haar* kamen noch weitere 12 Stämme zur Verwendung, die, wie in der vorangehenden Arbeit beschrieben wurde, von frischem bzw. eingesäuertem grünem Pflanzenmaterial isoliert worden waren.

Die Auswahl der Stämme erfolgte in der Weise, daß drei typische Vertreter von *B. coli* (Stamm *22*, *33* und *307*) zu den Untersuchungen herangezogen wurden, ein *B. synxanthum* (Nr. *317*), das ihnen in fast allen Eigenschaften glich, ferner zwei Vertreter der Gruppe *B. coli var. luteoliquefaciens*, die aus Milchzucker kein Gas bildeten, Gelatine verflüssigten und auf Bouillonagar in Form von gelbbräunlichen Kolonien wuchsen, sich aber sonst wie *B. coli* verhielten (Stamm *26* und *300*), weiterhin ein Stamm (Nr. *271*) der Gruppe *B. coli var. albidoliquefaciens* und zwei nicht indolbildende Stämme (Nr. *15* und *316*), die zum Typus *B. coli anindolicum* oder *B. coli communior* gehörten, und schließlich einige Stämme (Nr. *1*, *260* und *261*), die sich in ihren Eigenschaften vom typischen *B. coli* weiter entfernten und als *B. herbicola*-Arten galten[1]. Demnach befanden sich aus jeder größeren Gruppe ein oder mehrere Vertreter im Säureversuch.

c) Durchführung der Versuche. Zur Feststellung, bis zu welcher H-Ionenkonzentration die einzelnen Stämme in den verschieden angesäuerten Bouillonarten noch wuchsen, wurden zwei Serien von fünf Röhrchen, je eins mit den p_H-Werten 6,5, 6,0, 5,5, 5,0 und 4,5 von jedem Stamm und jeder Säure, angelegt und bei 30° im Brutschrank gehalten. Dabei wurden die Kulturen 7 Tage lang auf ihr Wachstum hin beobachtet. Sobald der stärkste Wachstumsgrad erreicht worden war und die Trübung nicht mehr zunahm, wurde der p_H-Wert der Kulturflüssigkeit bestimmt. Nach 7 Tagen erfolgte die Untersuchung auch der nur schwach oder gar nicht getrübten Röhrchen, bei denen, wie Kontrollen bewiesen, keine weitere Entwicklung der Bakterien mehr zu erwarten war. Die hauptsächlichsten Versuchsergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt, in der die Stärke der Trübung durch Kreuze wiedergegeben wurde. Ein Kreuz bezeichnet eine deutliche Trübung, durch die eine gute Entwicklung der Organismen zum Ausdruck gebracht werden soll.

Die Versuche wurden in diesem Falle außer mit Salz-, Phosphor-, Milch-, Essig- und Buttersäure noch mit Salpeter-, Schwefel-, Ameisen-, Oxal- und Weinsäure durchgeführt.

II. Versuchsergebnisse.

a) Allgemeines. Zunächst läßt sich feststellen, daß alle die Stämme, die ihren Eigenschaften nach echte *Coli*-Bakterien sind, also *B. coli*

---

[1] Man vergleiche dazu die vorangehende Arbeit von *G. Ruschmann* und *W. Meyer* (26).

Tabelle

Wachstum von *Coli*- und *coli*ähnlichen Organismen

Stamm Nr.	Salzsäure Anfangs-p_H 5,0* Wachstumsstärke	End-p_H	Salzsäure Anfangs-p_H 4,5 Wachstumsstärke	End-p_H	Phosphorsäure Anfangs-p_H 5,0 Wachstumsstärke	End-p_H	Phosphorsäure Anfangs-p_H 4,5 Wachstumsstärke	End p_H	Salpetersäure Anfangs-p_H 5,5 Wachstumsstärke	End-p_H	Salpetersäure Anfangs-p_H 5,0 Wachstumsstärke	End-p_H	Schwefelsäure Anfangs-p_H 5,5 Wachstumsstärke	End-p_H	Schwefelsäure Anfangs-p_H 5,0 Wachstumsstärke	End-p_H	Milchsäure Anfangs-p_H 5,5 Wachstumsstärke	End-p_H	Milchsäure Anfangs-p_H 5,0 Wachstumsstärke	End-p_H	Essigsäure Anfangs-p_H 6,5 Wachstumsstärke	End-p_H	Essigsäure Anfangs-p_H 6,0 Wachstumsstärke	End p_H
1	7§ (+)	5,6	7 0	4,5	7 +	5,7	7 0	4,5	6 +	6,0	7 0	5,0	6 +	5,8	7 0	5,0	3 +	6,0	4 +	5,6	1 +	7,0	7 +	6,5
15	1 +	5,4	3 +	5,1	1 +	5,5	3 +	4,9	1 +	6,1	2 +	5,5	1 +	5,9	2 +	5,4	1 +	5,9	1 +	5,3	1 ++	6,8	2 +	6,3
22	1 +	5,7	3 +	5,0	1 +	5,6	3 +	4,8	1 +	6,0	2 +	5,4	1 +	5,8	2 +	5,4	1 +	5,9	1 +	5,2	1 ++	6,9	1 +	6,1
26	7 (+)	5,4	7 0	4,5	7 (+)	5,3	7 0	4,5	6 +	6,1	7 0	5,0	4 +	6,1	7 0	5,0	7 0	5,5	7 0	5,0	6 +	6,6	7 0	6,0
33	2 +	5,6	3 +	5,0	1 +	5,6	3 +	5,0	1 +	5,9	2 +	5,5	1 +	6,0	2 +	5,5	1 +	6,0	1 +	5,2	1 +	6,7	2 +	6,3
260	6 +	5,7	7 0	4,5	6 +	5,6	7 0	4,5	2 +	5,9	7 0	5,0	2 ++	6,1	7 0	5,0	1 +	5,9	6 +	5,8	1 +	6,9	4 +	6,5
261	6 +	6,0	7 0	4,5	6 +	6,1	7 0	4,5	2 +	6,1	7 0	5,0	3 +	6,3	7 0	5,0	4 +	6,1	7 0	5,0	7 0	6,5	7 0	6,0
271	7 (+)	5,6	7 0	4,5	6 +	5,7	7 0	4,5	4 +	6,0	7 0	5,0	4 +	5,7	7 0	5,0	3 +	5,8	6 +	5,6	7 0	6,5	7 0	6,0
300	6 +	5,4	7 0	4,5	4 +	5,4	7 0	4,5	3 +	6,2	7 0	5,0	3 +	6,0	7 0	5,0	3 +	5,9	6 +	5,4	3 +	6,7	7 0	6 0
307	1 ++	5,6	7 0	4,5	1 ++	5,3	7 0	4,5	1 +	6,1	1 +	5,3	1 ++	5,9	1 ++	5,9	1 ++	5,9	1 +	5,5	1 ++	7,0	1 +	6,3
316	4 +	5,5	7 0	4,5	3 +	5,4	7 0	4,5	1 +	6,0	4 +	5,7	2 +	5,9	3 +	5,4	1 +	5,9	2 +	5,5	1 +	6,8	3 +	6,4
317	7 (+)	5,3	7 0	4,5	7 +	5,2	7 0	4,5	3 +	5,9	7 0	5,0	4 +	5,9	7 0	5,0	2 +	6,0	7 0	5,0	3 +	6,9	7 0	6,0
Bact. Coli Haar	1 +	5,5	3 +	4,9	1 +	5,4	3 +	5,0	1 +	6,1	1 +	5,4	1 +	6,0	2 +	5,4	1 +	5,7	1 +	5,2	1 +	6,6	1 +	6,2

* Sowohl die Reihen mit niedrigerem p_H, die kein Wachstum mehr ergaben, als auch die Reihen mit höherem p_H
Wachstumszeichen bedeuten die Tage, nach denen die p_H-Messung erfolgte und die Wachstumsstärke bestimmt wurde
stärke nach 4 Tagen = +, p_H = 6,6 Stamm *261* Wachstumsstärke nach 2 Tagen = +, p_H = 6,8.

I.

ın Bouillon mit verschiedenen Säurezusätzen.

Buttersäure						Ameisensäure						Oxalsäure						Weinsäure			
Anfangs-p_H 6,5		Anfangs-p_H 6,0		Anfangs-p_H 5,5		Anfangs-p_H 6,5		Anfangs-p_H 6,0		Anfangs-p_H 5,5		Anfangs-p_H 6,0		Anfangs-p_H 5,5		Anfangs-p_H 5,0		Anfangs-p_H 5,5		Anfangs-p_H 5,0	
Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H	Wachstumsstärke	End-p_H
4 +	7,0	7 0	6,0	7 0	5,5	2 +	6,9	7 0	6,0	—	—	7† 0.	6,0	7 0	5,5	—	—	3 +	5,8	7 0	5,0
1 +	6,8	2 +	6,2	7 0	5,5	1 +	6,8	2 +	6,7	3 +	6,3	1 +	6,2	1 +	5,6	2 +	5,2	1 +	5,6	1 +	5,2
1 ++	7,0	2 +	6,5	7 0	5,5	1 ++	7,1	2 ++	6,7	3 ++	6,9	1 +	6,2	1 +	5,7	2 +	5,2	1 +	6,0	1 +	5,2
6 +	6,7	7 0	6,0	7 0	5,5	2 +	7,0	6 +	6,3	7 0	5,5	3 +	6,3	7 0	5,5	—	—	3 +	5,9	7 0	5,0
2 +	6,8	7 0	6,0	7 0	5,5	1 +	6,9	2 ++	6,9	3 ++	6,3	1 +	6,2	1 +	5,6	2 +	5,3	1 +	5,9	1 +	5,3
1 +	6,8	6 +	6,7	7 0	5,5	1 +	6,6	7 0	6,0	—	—	2 ++	6,3	3 ++	6,1	7 0	5,0	3 ++	6,2	2 +	5,2
7 0	6,5	7 0	6,0	-	—	2 ++	7,1	7 0	6,0	—	—	7† 0	6,0	7 0	5,5	—	—	3 +	6,3	7 0	5,0
2 +	6,7	7 0	6,0	7 0	5,5	2 +	6,7	7 0	6,0	—	—	4 +	6,2	7 0	5,5	—	—	3 +	5,7	7 0	5,0
7 0	6,5	7 0	6,0	—	—	2 +	6,8	7 0	6,0	—	—	3 +	6,3	3 +	5,9	7 0	5,0	3 +	6,1	7 0	5,0
1 ++	7,0	1 +	6,2	6 (+)	5,6	1 ++	7,1	1 +	6,5	1 ++	6,3	1 +	6,3	1 +	5,7	1 +	5,3	1 +	5,9	1 +	5,3
1 +	6,7	3 +	6,3	7 0	5,5	1 +	6,7	3 +	6,6	7 0	5,5	2 +	6,2	3 +	5,9	3 +	5,2	3 +	5,7	2 +	5,2
7 0	6,5	7 0	6,0	—	—	2 ++	6,9	7 0	6,0	—	—	4 +	6,2	7 0	5,5	—	—	3 +	6,2	7 0	5,0
1 +	6,6	1 +	6,3	7 0	5,5	1 +	7,0	1 +	6,4	3 +	6,3	1 +	6,2	1 +	5,6	2 +	5,2	1 +	5,7	1 +	5,2

ie ein gleichmäßig gutes Wachstum zeigten, sind in der Tabelle fortgelassen worden — § Die Zahlen über den † Stamm 1 und 261 sind in der oxalsauren Bouillon nur bei einem p_H von 6,5 gewachsen Stamm 1 Wachstums-

Haar, Stamm *22*, *33* und *307*, höhere Säuregrade aushalten als die anderen. Eine Ausnahme davon macht merkwürdigerweise Stamm *307* in der salzsauren und phosphorsauren Bouillon, obwohl er in der buttersauren Nährlösung gerade am meisten Säure verträgt. Von den übrigen Organismen, die *B. coli* sehr nahe stehen, ist nur der nicht indolbildende Stamm *15* in stärker saurem Medium zum Wachsen befähigt. Dem zu derselben Gruppe gehörigen Stamm *316* fehlt dagegen diese Eigenschaft.

Eine große Empfindlichkeit gegen Säure weisen die Organismen auf, die in zuckerhaltigen Nährlösungen keine Gasbildung zeigen, Gelatine verflüssigen und, wie *B. coli*, Indol erzeugen. Hierzu gehören die Stämme *26* und *300* sowie Stamm *317*, der mit *B. coli* näher verwandt ist als jene. Ihre Säureempfindlichkeit kommt nicht nur darin zum Ausdruck, daß sie bei höheren Säuregraden nicht mehr wachsen, sondern auch darin, daß sie dort, wo für sie noch eine Entwicklung möglich ist, fast immer 3 oder mehr Tage benötigen, um eine deutliche Trübung der Bouillon hervorzurufen. Das gleiche Verhalten zeigen die übrigen Stämme, die hinsichtlich ihrer Eigenschaften nur geringe Ähnlichkeit mit *B. coli* aufweisen.

Diese Beobachtungen stimmen u. a. mit denen von *R. Koch* (20) überein, nach dessen Untersuchungen typische *Coli*-Stämme gegen Säure viel widerstandsfähiger sind als atypische. Eine Ausnahme von dieser Regel bildete hier nur der nicht indolbildende Stamm *15*.

b) Vergleich der einzelnen Säuren. Es fällt zuerst auf, daß die Mineralsäuren von den Organismen vielfach besser vertragen werden als die organischen Säuren. Während ein p_H von 4,5, das durch Mineralsäuren hervorgerufen wurde, noch einigen Stämmen die Möglichkeit zur Entwicklung ließ, unterband es das Wachstum stets, wenn es durch Zusatz organischer Säuren bedingt war[1].

1. Die Mineralsäuren. Die Organismen erwiesen sich als verhältnismäßig wenig empfindlich gegen *Salz-* und *Phosphorsäure*, von denen einige Stämme noch Mengen vertrugen, die einem p_H von 4,5 entsprachen, während alle noch bei einem p_H von 5,0 fortkamen. Auch die Zeiten, die die Organismen brauchten, um sich in diesen Bouillonarten zu entwickeln und eine Trübung hervorzurufen, waren annähernd die gleichen. Doch wirkte Phosphorsäure in einigen Fällen noch etwas weniger hemmend als Salzsäure, was wohl damit zusammenhängt, daß die Phosphorsäure teilweise zum Aufbau der Bakterienzelle verwendet wird.

Salpeter- und *Schwefelsäure* wurden durchweg noch bis zu einer H-Ionenkonzentration von 5,5 vertragen und bewirkten keine Verschieden-

[1] Bei Beurteilung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß teils die Anionen, teils die ganzen Moleküle wirksam sind. Nur unter dieser Voraussetzung sind die Säuren von demselben p_H miteinander vergleichbar.

heiten in den Wachstumszeiten. Die typischen *Coli*-Stämme waren auch hier widerstandsfähiger als die ihnen verwandtschaftlich fernerstehenden Organismen.

2. *Die organischen Säuren. Milch-* und *Weinsäure* nehmen wegen ihrer weniger schädlichen Wirkung auf die Bakterien eine Mittelstellung unter den aufgeführten Säuren ein. Einzelne atypische *Coli*-Arten werden von ihnen sogar weniger nachteilig beeinflußt als von den beiden zuletzt genannten Mineralsäuren. Mit wenigen Ausnahmen wird von allen Stämmen besonders die Milchsäure noch bis zu einem p_H von 5,0 vertragen. Nur die Indolbildner, die wenig oder kein Gas erzeugen (Nr. *26* und *317*) und ein atypischer Stamm (*261*) wachsen bei dieser Wasserstoffionenkonzentration der Milchsäure nicht mehr, während sich in der weinsauren Lösung bei demselben p_H neben den ausgesprochenen *Coli*-Stämmen (*22, 33* und *307*) nur noch *B. anindolicum* (Nr. *15* und *316*) und der von *B. coli* stark abweichende Stamm *261* entwickeln.

Als besonders empfindlich gegen organische Säuren erweist sich der nicht indolbildende Stamm *26*, der auffallenderweise gerade die Milchsäure schlecht verträgt. Er wächst nicht einmal in einer milchsauren Bouillon mit einem p_H von 6,5.

Die Widerstandsfähigkeit der Organismen gegen *Oxalsäure* ist im allgemeinen etwas geringer als die gegen die beiden vorher genannten Säuren, was sowohl durch die Wachstumsgrenze zum Ausdruck kommt — Stamm *1* und *261* wachsen nur bei einem p_H von 6,5 — als auch durch die Zeit, die die Kulturen zum Anwachsen benötigen. Selbst bei den schwächeren Säuregraden dauert es meist mehrere Tage, ehe eine kräftige Entwicklung zu sehen ist. Nur die ausgesprochenen *Coli*-Stämme vertragen wieder eine etwas höhere Wasserstoffionenkonzentration.

Die bekannte bakterizide Wirkung der *Ameisensäure* macht sich dadurch bemerkbar, daß die überwiegende Mehrzahl der Organismen nur noch bei einem p_H von 6,5 in der sauren Bouillon gedeiht. Die typischen *Coli*-Stämme und die beiden nicht indolbildenden, aber sonst wie *B. coli* sich verhaltenden Stämme *15* und *316* kommen noch bei einem p_H von 6,0 fort. Eine H-Ionenkonzentration von 5,5 vermögen wiederum nur die ausgesprochenen *Coli*-Arten und der Stamm *15*, der stets eine Sonderstellung einnimmt, zu ertragen.

Im Gegensatz zu den bisher genannten Säuren üben *Essig-* und *Buttersäure* eine bemerkenswerte starke Wirkung auf die Bakterien aus, doch ist die Essigsäure etwas weniger schädlich als die Buttersäure. Für beide Säuren liegt die Wachstumsgrenze im allgemeinen bei einem p_H von 6,5. Bei der Buttersäure wird indessen auch dieser Säuregrad von den *Coli*-Arten, die wenig oder kein Gas erzeugen, nicht mehr ver-

tragen. Der von einem normalen *B. coli* stark abweichende Stamm *261* wächst weder in der essigsauren noch in der buttersauren Bouillon bei einem p_H von 6,5.

Wie bei den bisherigen Versuchen war der Einfluß auch der Buttersäure am stärksten bei den nicht oder nur wenig gasbildenden, sonst aber *coli*ähnlichen Stammen *26, 300* und *317*. Dabei fiel auf, daß sich die beiden zuletzt genannten Stämme in buttersaurer Bouillon nicht entwickelten, während Stamm *26*, der sonst die größte Säureempfindlichkeit zeigte, darin noch bei einem p_H von 6,5 wuchs, jedoch erst nach 6 Tagen eine deutliche Trübung der Kultur hervorrief. Das typische *B. coli 307* nahm insofern eine besondere Stellung ein, als es in buttersaurer Bouillon noch bei einem p_H von 5,5 gedieh.

Daß die drei zuletzt genannten organischen Säuren, die häufiger im Stoffwechsel von Bakterien auftreten, schädlicher als andere Säuren wirken, ist auch deshalb verwunderlich, weil sie doch unter günstigen Bedingungen von den Organismen abgebaut werden. Die Milchsäure, die ebenfalls von *Coli*-Arten gebildet wird, ist allerdings besonders leicht angreifbar. Aus diesem Grunde durfte sie auch, wie die vorliegenden Untersuchungen beweisen, weniger nachteilig sein.

Aus dem End-p_H der Kulturen läßt sich zunächst erkennen, daß mit der Entwicklung der *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien eine deutliche Herabsetzung des Säuregrades verbunden ist. Sie wird durch die Eiweißzersetzung bewirkt und hat zur Folge, daß sich die Organismen in der nun weniger sauren Nährflussigkeit besser entwickeln. Das kommt besonders in den späteren Versuchen bei den erst nach 8 bis 10 Tagen umgeimpften Kulturen zum Ausdruck, die zu dieser Zeit fast durchweg eine starke Trubung aufwiesen.

Die meist kraftigere Verschiebung des p_H-Wertes nach der alkalischen Seite hin in den Lösungen mit niedrigerem Säuregrad erklart sich ohne weiteres daraus, daß hier die Wachstumsbehinderung durch die Säure erheblich geringer war. Auffallend ist es, wie stark sich die Abnahme der H-Ionenkonzentration in denjenigen Kulturen bemerkbar machte, die schon nach 1 Tag untersucht wurden. Sie betrug in manchen Fällen 0,5 p_H-Einheiten und mehr. Dies trat besonders bei den Mineralsäuren und der Milchsäure in Erscheinung, bei denen es fast uberall zu beobachten war.

In den Kulturen mit den anderen organischen Säuren veränderten vor allem die typischen *Coli*-Arten und die von ihnen *stark* abweichenden Stämme infolge Eiweißzersetzung weitgehend den p_H-Wert. Die gelatineverflüssigenden nicht gasbildenden, aber indolerzeugenden Stämme wiesen diese Eigenschaft in weniger starkem Maße auf. Hieraus ist wiederum die größere Säureempfindlichkeit dieser Organismen zu erkennen, die schon aus den übrigen Befunden deutlich hervorging.

B. Verhalten von Milchsäurebakterien in saurer Traubenzuckerbouillon.

Bei der Einsäuerung von Futter- und Nahrungsmitteln spielt die Unterdrückung der *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien durch *Milchsäurebakterien* eine große Rolle. Sie gelingt dadurch, daß man den Milchsäurebakterien so günstige Entwicklungsbedingungen bietet, daß eine schnelle und starke Säurebildung eintritt. Dadurch werden die genannten Begleitorganismen nicht nur bald in ihrer Tätigkeit behindert, sondern auch in kurzer Zeit vernichtet. Demnach können die kräftig säuernden Milchsäurebakterien, zu denen vor allem die stäbchenförmigen Arten (*Lactobazillen*) gehören, eine höhere H-Ionenkonzentration als die *coli*ähnlichen Organismen erzeugen und vertragen. Um die vorher geschilderten Eigenschaften der *coli*ähnlichen Bakterien mit denen einiger typischer Milchsäurebakterien zu vergleichen, wurden ähnliche Versuche mit drei aus Silofutter isolierten Milchsäurebakterienstämmen und mit *Bacterium cucumeris fermentati* durchgeführt, das bekanntlich häufiger zum Impfen von Grünfutter bei der Konservierung benutzt wird. Da sich die Milchsäurebakterien in einfacher Nährbouillon nur schlecht entwickeln, erhielt diese einen Zusatz von 2% Traubenzucker. Für die Versuche mit *B. coli* war absichtlich keine zuckerhaltige Nährlösung benutzt worden, da das Ergebnis durch Säurebildung hätte beeinflußt werden müssen; dies ist allerdings auch bei den folgenden Versuchen mit Milchsäurebakterien zu berücksichtigen.

Hauptsächlich war wiederum die Frage zu prüfen, bei welchem Anfangs-p_H der Nährlösung sich die Milchsäurebakterien noch entwickelten, und in welcher Weise sich dabei die Reaktion veränderte. Wie aus Tabelle II zu ersehen ist, lagen für die hier verwendeten Säuren, Salzsäure, Essigsäure und Buttersäure, die Verhältnisse ähnlich wie bei dem vorangehenden Versuch mit den verschiedenen *Coli*-Stämmen. Die Mineralsäure zeigte sich im allgemeinen weniger schädlich als die organischen Säuren; andrerseits waren die Milchsäurebakterien gegenüber allen Säuren deutlich widerstandsfähiger als die *Coli*-Arten.

Diesen Erkenntnissen kommt für die Einsäuerung von Grünfutter und anderen pflanzlichen Materialien große Bedeutung zu, da aus ihnen hervorgeht, weshalb die Milchsäurebakterien bei einem normalen Verlauf der Gärungen die letzten im Silofutter übrigbleibenden Organismen sind. Hiermit lassen sich weiterhin auch die mit dem Ansäuerungsverfahren in der Praxis erzielten Erfolge erklären, die darauf zurückzuführen sind, daß sich die Milchsäurebakterien als besonders widerstandsfähig gegen die bei dem genannten Verfahren vorwiegend zur Verwendung kommende Salzsäure erwiesen haben.

Salzsäure wurde von allen hier benutzten Milchsäurebakterienstämmen bis zu einer H-Ionenkonzentration von p_H 4,5 vertragen.

Tabelle II.

Wachstum von Milchsäurebakterien in Traubenzuckerbouillon mit verschiedenen Säurezusätzen[1].

Stamm	Salzsäure				Essigsäure				Buttersäure				Ohne Zusatz, neutral
	Anfangs- p_H 5,0		Anfangs- p_H 4,5		Anfangs- p_H 5,0		Anfangs- p_H 4,5		Anfangs- p_H 5,0		Anfangs- p_H 4,5		
Nr.	Wachstums-stärke	End- p_H*	Wachstums-stärke	End- p_H	Wachstums-stärke	End- p_H	Wachstums-stärke	End- p_H	Wachstums-stärke	End- p_H	Wachstums-stärke	End- p_H	End- p_H
35	++	4,1	+	3,8	+	4,3	0	4,5	+	4,3	0	4,5	3,5
48	++	4,1	+	3,9	+	4,4	0	4,5	+	4,3	0	4,5	3,5
56	++	3,8	++	3,5	++	3,9	++	3,8	++	3,9	+	3,9	3,4
Bact. cucum. ferm.	++	3,7	+	3,6	++	3,7	+	3,9	++	3,9	+	3,9	3,4

* Bestimmung des End-p_H stets nach 21 Tagen.

Für die p_H-Werte über 5,5 sind die Ergebnisse in der Tabelle II nicht aufgeführt, da sie keine neuen Gesichtspunkte ergaben. Essigsaure und Buttersäure ließen einen deutlichen wachstumshemmenden Einfluß erkennen, wie daraus hervorging, daß die Entwicklungsgrenze für die beiden Stamme *35* und *48* bei p_H 5,0 lag. Außerdem erreichte die Säuerung in allen diesen Kulturen nach 3 Wochen bei 30° nicht dieselbe Stärke wie in den Kulturen mit Salzsäure. Ein Vergleich mit den Säuregraden, die durch Vergärung des Traubenzuckers mit Milchsäurebakterien in der neutralen Bouillon entstanden waren, zeigte, daß der Säurezusatz in jedem Falle einen Einfluß auf die Tätigkeit der Organismen ausübte. Das End-p_H der mit Säure versetzten Nahrlösungen war stets höher als das der neutralen Bouillon.

Zur Prufung der Frage, ob sich die Organismen durch häufigeres Umsetzen in der sauren Bouillon an stärkere Säurekonzentrationen gewöhnen, wurden die vier Milchsaurebakterienstämme aus den Nährflüssigkeiten mit den verschiedenen Säuren in Abständen von 21 Tagen übergeimpft. Es gelang aber auf diese Weise bei achtmaligem Umsetzen nicht, ein Anwachsen der Organismen in einer Bouillon mit der nächst höheren Azidität zu erzielen. Hierbei erwies sich die Essigsäure in einzelnen Fällen als besonders schädlich für die Milchsäurebakterien, da die beiden Stämme *35* und *48* nach viermaligem Umsetzen in der essigsauren Bouillon auch nicht mehr bei einem p_H von 5,0 anwuchsen. Die Organismen waren, wie eine Überimpfung in die neutrale Nährflussigkeit und in Maische bewies, vollständig eingegangen.

[1] Erklärungen wie in Tabelle I.

C. Veränderlichkeit der Coli-Stämme bei Fortzüchtung in saurer Bouillon.

Nachdem die p_H-Grenze für die verschiedenen *Coli-* und *coli*-ähnlichen Stämme in saurer Bouillon festgelegt worden war, sollten Versuche darüber angestellt werden, ob durch die Einwirkung der Säuren Veränderungen an den Organismen in morphologischer oder physiologischer Hinsicht hervorgerufen würden. Gleichzeitig wurde die Anpassungsfähigkeit der *Coli*-Arten an ungünstigere Verhältnisse, die durch den Zusatz von Säuren bedingt waren, geprüft.

I. Versuchsanordnung.

Die einzelnen Stämme wurden in Bouillon geimpft, die durch die verschiedenen Säuren auf das für jeden Organismus ermittelte Grenz-p_H eingestellt worden war. Es kamen dabei wiederum schmale Reagenzgläschen mit je 3 ccm Nährlösung zur Verwendung. Die Beimpfung erfolgte durch eine stets gleich große Öse voll einer Aufschwemmung, die unter Benutzung von 24 Stunden alten Bouillonagarschrägkulturen und sterilem Leitungswasser gewonnen war. Die beimpften Röhrchen kamen dann 8 Tage lang bei 30° in den Brutschrank. Nach dieser Zeit war überall ein gleichmäßiges starkes Wachstum eingetreten. Am neunten Tage erfolgte immer das Überimpfen der Kulturen in neue Bouillonröhrchen mit der gleichen Säure und demselben p_H.

Unmittelbar vor Beginn des Versuches wurden die auf Bouillonagar gezüchteten Stämme noch einmal auf alle ihre Eigenschaften hin geprüft, damit Sicherheit bestand, daß sie sich während des längeren Aufenthaltes in dieser Nährflüssigkeit nicht verändert hatten. Dabei kamen folgende Untersuchungsverfahren zur Anwendung: 1. Bouillonagarplatte zur Bestimmung der Form, Farbe und Größe der Kolonien sowie der mikroskopischen Eigenschaften der Organismen. 2. Einfache Nährbouillon zur Prüfung auf Indolbildung und Beweglichkeit. 3. Traubenzuckerbouillon und Traubenzuckerbouillonagar zur Feststellung der Organismen auf ihre Fähigkeit, Gas und Säure zu bilden. 4. Milchzuckerbouillon und Milchzuckerbouillonagar sowie Galle-Lactose-Gentianaviolett-Peptonwasser ebenfalls zur Prüfung auf Gas- und Säurebildung. 5. Milch. 6. *Voges-Proskauer*-Nährlösung zum Nachweis der Azetoinbildung und zur Anstellung der Methylrotprobe. 7. *Kosers* Citratlösung. 8. Harnsäureprobe. 9. Bouillongelatinestich zur Prüfung auf Gelatineverflüssigung.

Alle Stämme ließen bei dieser Untersuchung keinerlei Veränderungen ihrer bei der Isolierung festgestellten Eigenschaften [vgl. *G. Ruschmann* und *W. Meyer* (26)] erkennen. Nach längerer Fortzüchtung der Kulturen in saurer Bouillon wurden die genannten Prüfungen in der gleichen Weise wiederholt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind, namentlich soweit sie Abweichungen von den früheren Angaben zeigen, in Tabelle III aufgeführt.

II. Ergebnisse.

Nach fünfmaligem Umsetzen der Stämme in der sauren Nährlösung wurden sie zum ersten Male auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Doch waren bis dahin so gut wie keine Veränderungen eingetreten.

Tabelle III.

Veränderungen der Coli- und coliähnlichen Stämme nach längerer Züchtung in saurer Bouillon.

Stamm	Salzsäure				Phosphorsäure				Milchsäure				Essigsäure				Buttersäure			
	direkt gewachsen		nach Anpassung gewachsen		direkt gewachsen		nach Anpassung gewachsen		direkt gewachsen		nach Anpassung gewachsen		direkt gewachsen		nach Anpassung gewachsen		direkt gewachsen		nach Anpassung gewachsen	
Nr.	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen	bei p_H	Veränderungen
1	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	6,0	11. U. eing. 0	—	—	6,5	0	—	—
15	4,5	0	—	—	4,5	0	—	—	5,0	G. ≫ S. >	—	—	6,0	11. U eing G. > S. >	—	—	6,0	G. ≫ S. >	—	—
22	4,5	G. ≫ S. >	—	—	4,5	G. ≫ S. >	—	—	5,0	G. > S. >	—	—	6,0	11. U. eing. G. > S >	—	—	6,0	G. > S. >	—	—
26	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	—	—	—	—	6,5	0	6,0	0	6,5	0	6,0	0
33	4,5	G ≫ S. >	—	—	4,5	G. ≫ S. >	—	—	5,0	G. ≫ S >	—	—	6,0	11. U. eing. G. > S. >	—	—	6,5	G. ≫ S. ≫	6,0	G. ≫ S. >
260	5,0	Schl.	4,5	Schl.	5,0	Schl.	4,5	Schl.	5,0	Schl.	—	—	6,0	11. U. eing. 0	—	—	6,0	0	—	—
261	5,0	Schl. + Fl.	—	—	5,0	Schl. + Fl.	4,5	Schl + Fl.	5,5	Schl. Fl.	5,0	Schl Fl.	—	—	—	—	—	—	—	—
271	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	—	—	—	—	6,5	0	—	—
300	5,0	0	—	—	5,0	0	4,5	0	5,0	0	—	—	6,5	0	6,0	0	—	—	—	—
307	5,0	G. ≫ S. >	4,5	G ≫ S. >	5,0	G. ≫ S. >	4,5	G ≫ S. >	5,0	G. ≫ S. >	—	—	6,0	G. ≫ S. >	5,5	G. > S. >	5,5	G. > S. >	—	—
316	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	6,0	11. U. eing. 0	—	—	6,0	0	—	—
317	5,0	0	—	—	5,0	0	—	—	5,5	0	5,0	0	6,5	0	6,0	0	—	—	—	—
B coli Haar	4,5	0	—	—	4,5	0	—	—	5,0	0	—	—	6,0	0	—	—	6,0	0	—	—

Zeichenerklärung: 0 = keine Veränderungen G = erhöhte Gasbildung in zuckerhaltigen Nährboden: S. = erhöhte Säurebildung in zuckerhaltigen Nährboden. Die Anzahl der Winkel (>) bedeutet die Stärke der Erhohung. 11 U eing. = bei der 11. Umsetzung eingegangen Schl. = Schleimbildung, + hinter Schl. = starke Schleimbildung, Fl. = Fluoreszieren der Kultur.

Nur der stark atypische Stamm *261* machte hiervon insofern eine Ausnahme, als er beim Wachstum in saurem Medium eine grüngelbliche Farbstoffbildung ähnlich der von *B. fluorescens* zeigte, die aber auf neutralem Nährboden sofort wieder verschwand. Versuche mit diesem Stamm auf saurem Bouillonagar führten zu demselben Ergebnis, und zwar trat das Fluoreszieren hier um so deutlicher auf, je saurer der Nährboden war. Es gelang aber nicht, dem Organismus diese Eigenschaft durch kurz aufeinanderfolgendes Überimpfen (25mal alle 2 Tage) auf saurem Bouillonagar anzuzüchten. Eine Prüfung der Kultur auf Reinheit durch wiederholte Anwendung des Plattengußverfahrens bewies, daß eine Verunreinigung nicht vorlag. Das Auftreten des Fluoreszierens war demnach lediglich eine Reaktionserscheinung.

a) Anpassung der Organismen an höhere Säuregrade. Die Stämme wurden nach dem fünften Überimpfen auch darauf geprüft, ob sie sich so weit an das saure Medium gewöhnt hatten, daß sie in einer stärker sauren Bouillon gedeihen konnten. Jeder Stamm wurde zu diesem Zweck in eine um 0,5 p_H-Einheiten saurere Nährlösung gesetzt. Doch trat in keinem Fall Wachstum ein. Dieser Versuch wurde nach achtmaligem Umsetzen wiederholt, wobei sich herausstellte, daß jetzt einige Stämme unter den ungünstigen Bedingungen wuchsen. Es waren das der nicht gasbildende gelatineverflüssigende Indolbildner Nr. *300* und die stark atypischen *coli*ähnlichen Stämme Nr. *260* und *261*. Sie hatten sich an die mit *Mineralsäuren* angesäuerte Bouillon so weit gewöhnt, daß sie auch bei einem p_H von 4,5 noch zur Entwicklung gelangten. Das gleiche Verhalten wies der typische *Coli*-Stamm Nr. *307* auf. In einer Bouillon von noch höherer Azidität war aber in keinem Fall mehr Wachstum zu erzielen.

Ein ähnliches Bild ergaben die Kulturen mit den *organischen Säuren*. Ein Unterschied gegenüber den Versuchen mit Mineralsäuren lag darin, daß nur die Stämme, die vorher unter der Höchstgrenze für das Wachstum in saurer Bouillon geblieben waren, eine Anpassung zeigten, indem sie jetzt dieselben p_H-Werte wie die übrigen Stämme erreichten. Eine Ausnahme machten die beiden in ihren Eigenschaften von einem echten *B. coli* stark abweichenden Stämme *1* und *271*, die in der buttersauren Bouillon nur ein p_H von 6,5 vertrugen, während die Grenze für die anderen Organismen nach der Gewöhnung bei p_H 6,0 lag. Ausgenommen davon war der typische *Coli*-Stamm Nr. *307*, der als einziger eine noch weitergehende Anpassung an den Tag legte. Er wuchs in der essigsauren Bouillon noch bei einem p_H von 5,5.

Die Wiederholung des Versuches, nachdem die Stämme 14mal in der sauren Bouillon umgesetzt worden waren, ergab nichts wesentlich Neues. Man kann deshalb wohl abschließend sagen, daß für die hier

in Frage kommenden *Coli-* und *coli*ähnlichen Bakterien die geprüften Säuren und die p_H-Grenzen nach der sauren Seite hin folgendermaßen liegen:

Für *Salzsäure* zwischen p_H 5,0 und 4,5, wobei die typischen *Coli*-Arten die p_H-Grenze von 4,5 für gewöhnlich auch ohne Anpassung erreichen. In einzelnen Fällen tritt eine Anpassung bei den atypischen *Coli*-Stämmen ein.

Für *Phosphorsäure* ebenfalls zwischen p_H 5,0 und 4,5. Die p_H-Grenze von 4,5 wird von den typischen *Coli*-Bakterien ebenso wie bei der *Salzsäure* meist ohne besondere Vorzüchtung erreicht, doch sind die Fälle, in denen die atypischen Formen erst nach Anpassung bei einem p_H von 4,5 wachsen, hier etwas häufiger; die Phosphorsäure steht also letzten Endes ebenso günstig wie die Salzsäure da.

Für *Milchsäure* bei einem p_H von 5,0; bei diesem Säuregrad kommen nur einige wenige atypische Organismen der *Coli*-Gruppe zur Entwicklung.

Für *Essigsäure* ist die p_H-Grenze 6,0, bei der aber nur einige *coli*-ähnliche Organismen nach Gewöhnung wachsen. Einzelne Stämme entwickelten sich schon nicht mehr bei einem p_H von 6,5.

Für *Buttersäure* beträgt das Grenz-p_H, ähnlich wie für Essigsäure, 6,5 bis 6,0; während die typischen *Coli*-Stämme ein p_H von 6,0 auch ohne Anpassung erreichen, wachsen rund 40% der atypischen Stämme überhaupt nicht bei Anwesenheit dieser Säure. Von den übrigen Stämmen, die unter dieser Bedingung wuchsen, gewöhnten sich 50% an ein p_H von 6,0.

b) Veränderlichkeit der Organismen. An den Stämmen, die achtmal umgesetzt worden waren, ließen sich Veränderungen irgendwelcher Art noch nicht erkennen. Eine auffällige Beobachtung wurde jedoch nach zehnmaligem Überimpfen der Organismen in der essigsauren Bouillon gemacht. Sechs von den dreizehn Stämmen wuchsen nun nicht mehr bei einem p_H von 6,0, sondern nur noch bei einem solchen von 6,5 und gingen auch dann nach viermaligem Umsetzen ein.

Da der Säuregrad der Nährflüssigkeit immer genau geprüft wurde und andere, gleichzeitig in die Säurebouillon übergeimpften Stämme — auch die, die sich erst vor kurzem an ein p_H von 6,0 gewöhnt hatten — nicht beeinflußt worden waren, konnte die Erscheinung nicht mit zunehmender Säurekonzentration zusammenhängen. Offenbar wirkte die Essigsäure auf die Organismen besonders giftig, wenn sich diese längere Zeit in einer damit versetzten Bouillon aufhielten. Bei dem Versuch mit buttersaurer Bouillon war dies nicht festzustellen, so daß also die Essigsäure auf die Dauer einen schädlicheren Einfluß ausübte als die Buttersäure, die doch als sehr giftig bekannt ist.

Eine Beziehung zwischen den verschiedenen *Coli*- und *coli*ähnlichen Gruppen und ihrem Verhalten in der essigsauren Bouillon ließ sich nicht feststellen, da sowohl typische *Coli*-Stämme (Nr. *22* und *33*) als auch Vertreter aller anderen Gruppen darunter waren. Nur die beiden Stämme *Coli Haar* und Nr. *307* konnten sich auf die Dauer bei einem p_H von 6,0 in dieser Nährflüssigkeit gut halten.

Sowohl die Stämme, die mit der Zeit eingingen, als auch die übrigen wurden nach zehnmaligem Überimpfen auf ihre Eigenschaften hin genau geprüft. In morphologischer Hinsicht waren bei keinem der Stämme merkliche Veränderungen eingetreten. Auch physiologisch zeigten die Organismen im großen und ganzen ungeschwächt dieselben Merkmale wie vorher. Ihr Verhalten in gewöhnlicher Nährbouillon, in Milch, in der *Voges-Proskauer*-, der *Koser*schen Citrat- und in der Harnsäurelösung sowie auf Gelatine blieb in jedem Falle unverändert.

Nur in der Gas- und Säurebildung auf zuckerhaltigen Nährböden waren bei manchen Organismen Abweichungen bemerkbar. Die echten *Coli*-Stämme, mit Ausnahme von *B. coli Haar* und Stamm *15*, der sich schon bei den Untersuchungen über die p_H-Grenze genau so wie die ausgesprochenen *Coli*-Arten verhalten hatte, zeigten in dieser Hinsicht deutlich kräftigere Eigenschaften. Stamm *15* hatte sich allerdings nur in den mit organischen Säuren angesäuerten Bouillonarten verändert. Die verstärkte Gas- und Säurebildung erwies sich bei Fortzüchtung der Organismen auf neutralem Bouillonschrägagar und wiederholter Prüfung ihrer Eigenschaften als konstant. Dagegen ging den beiden stark atypischen Stämmen *260* und *261* bei längerem Aufenthalt auf Bouillonschrägagar die kräftige Schleimbildung, die sie nach der Einwirkung der Säuren gezeigt hatten, rasch verloren.

Die am Leben gebliebenen Stämme wurden weiter bis zum 14. Male in der sauren Nährflüssigkeit umgesetzt. Bei eingehender Prüfung der Organismen nach dieser Behandlung waren keinerlei Veränderungen gegenüber den Kulturen nach zehnmaligem Umsetzen eingetreten. Auch die Organismen, die sich nach dem achten Überimpfen an einen höheren Säuregrad angepaßt hatten, zeigten nach 14maligem Umsetzen keine anderen Veränderungen wie die Stämme, die schon ohne Gewöhnung bei einem niedrigeren p_H-Wert gewachsen waren.

Aus den vorliegenden Versuchen geht also mit Deutlichkeit hervor, daß es durch längeres Fortzüchten von *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien in Bouillon, die mit anorganischen oder organischen Säuren angesäuert wurde, nicht gelingt, eine Umwandlung der Organismen zu erzielen. Im wesentlichen hatte sich bei einigen von ihnen nur die Gas- und Säurebildung verstärkt.

Die Ansicht von *C. Hüttig* (17) (18), daß bei der Einsäuerung von grünen Pflanzen ein Teil der Milchsäurebakterien durch Umwandlung der auf diesem Material sehr zahlreich vorkommenden *Coli-* und *coli*-ähnlichen Organismen „entstehen“, kann nach dem hier Gesagten ebensowenig wie auf Grund der früher mitgeteilten Untersuchungsergebnisse [*G. Ruschmann* und *W. Meyer* (26)] bestätigt werden. Irgendeine Veränderung hätte sich sonst bei diesen Versuchen an den Bakterien sicher beobachten lassen. Das schnelle Verschwinden von *B. coli* erklärt sich vielmehr durch das Überhandnehmen der Milchsäurebakterien und die fortschreitende Säuerung, infolge deren die *coli*-ähnlichen Bakterien immer mehr unterdrückt werden. Die Milchsäurebakterien erscheinen auf den Plattengußkulturen deshalb nicht, weil sie neben den zahlreichen übrigen Bakterien und Pilzen im frischen Futter sehr in der Minderzahl sind.

D. Coli- und coliähnliche Bakterien in Mischkultur mit Milchsäure- und Essigsäurebakterien.

Bei den folgenden Versuchen handelte es sich um die Frage, bis zu welcher Grenze die *Coli*-Stämme die Säuerung des Nährmediums vertrugen, wenn die Säuren durch Gärung darin entstanden, und welche Veränderungen sie dabei zeigten. Über die bisherigen Ergebnisse auf diesem Gebiet vergleiche man die bereits besprochenen Angaben von *C. E. Cahn-Bronner* (7), *K. Scheer* (28, 29), *K. G. Dernby* (10), *L. Michaelis* und *Marcora* (23), *K. Brünn* (6), *K. Ishimori* (19), *H. Braun* und *C. Cahn-Bronner* (5) und *M. Löweneck* (21).

I. Versuche mit Milchsaurebakterien.

a) Versuchsanordnung. Zur Erzielung einer kräftigen Milchsäuregärung wurden bei diesen Versuchen *B. cucumeris fermentati* und als Nährflüssigkeit sowohl Maische ohne Kreide mit einem p_H von 5,5 als auch neutrale Traubenzuckerbouillon verwendet. In Vorversuchen konnte zunächst festgestellt werden, daß *B. cucumeris fermentati* in der Maische schon in 1 Tage eine Säuerung bis zu einem p_H von 3,2 und in der Traubenzuckerbouillon eine solche bis zu einem p_H von 4,8 hervorrief. Nach 2 Tagen war das p_H in der zuletzt genannten Nährlösung bis 4,2 und nach 4 Tagen bis auf 3,8 gestiegen. Für die *Coli-* und *coli*ähnlichen Stämme betrugen die entsprechenden Werte für die Maische 4,8 und für die Traubenzuckerbouillon 5,9, 4,9 bis 5,0 und 4,7.

Von den zur Verfügung stehenden Stämmen wurden in diesem Versuch neben *B. coli Haar* der typische *Coli*-Stamm *307*, *B. coli anindolicum* Nr. *15*, *Bact. coli var. luteoliquefaciens* Nr. *26* und *Bact. herbicola* Nr. *260* benutzt. Da sich der Versuch auf mehrere Tage erstrecken sollte, wurde sowohl von der Maische als auch von der Traubenzuckerbouillon für jeden Tag und jeden Stamm ein besonderes Röhrchen benötigt.

Alle Versuchsröhrchen wurden zunächst mit je einer kleinen Öse voll einer 24 Stunden alten Maischekultur von *B. cucumeris fermentati* beimpft. Als Impfmaterial für die *Coli*- und *coli*ähnlichen Stämme dienten 24 Stunden alte, gut angewachsene Bouillonagarkulturen, von denen mit 6 ccm sterilen Leitungswassers gleichmäßige, gut getrübte Abschwemmungen hergestellt wurden. Hiervon gelangte wiederum eine Öse voll in die Röhrchen. Es wurden also für die sechs verschiedenen Tage, an denen eine Untersuchung vorzunehmen war, von jedem *Coli*-Stamm je ein Maische- und ein Traubenzuckerbouillonröhrchen angesetzt.

b) Versuchsergebnisse. In Tabelle IV, in der nur etwas über die Art der Säuerung und das Verhalten der einzelnen Organismen gegenüber den Säuren gesagt wird, sind die Ergebnisse zusammengefaßt worden. Auf morphologische und physiologische Angaben über die *Coli*- und *coli*ähnlichen Stämme konnte verzichtet werden, da sich in dieser Richtung keinerlei Unterschiede zwischen den von neuem isolierten Organismen und den Ausgangsstämmen ergaben.

Zunächst ist aus Tabelle IV ersichtlich, daß die Säuerung der Mischkulturen im Vergleich zu der durch *B. cucumeris fermentati* im Vorversuch anfänglich etwas geringer war. Die p_H-Zahlen der beiden Nährlösungen für die Mischkulturen liegen um 0,2 bis 0,3 Einh. höher. Zwischen dem End-p_H der einzelnen *Coli*- und der Mischkulturen bestehen dagegen erheblich größere Unterschiede, aus denen hervorgeht, daß in den Mischkulturen stets höhere H-Ionenkonzentrationen herrschen als in den Reinkulturen der *Coli*-Stämme. *B. cucumeris fermentati* wird demnach in seiner Lebenstätigkeit durch die Gegenwart von *B. coli* etwas gehemmt, entwickelt sich aber andererseits so schnell, daß die Begleitorganismen infolge der Säuerung zugrunde gehen müssen.

1. Maischekulturen. Viel interessanter als die genannten Ergebnisse ist das Verhalten der *Coli*-Stämme in den Mischkulturen. In der Maische, in der die Säuerung sehr rasch vonstatten geht, sind, wie die Plattengußkulturen zeigten, bereits nach 1 Tage Stamm *260* (*B. herbicola*) und *26* (*B. luteoliquefaciens*) abgestorben, wahrend die übrigen sich noch gehalten haben. Am zweiten Tage ist Stamm *15* (*B. anindolicum*) eingegangen, und nur die typischen *Coli*-Arten sind noch lebensfähig. Am fünften Tage erscheint auch *B. coli Haar* nicht mehr auf den Plattenkulturen. Stamm *307* dagegen, der bei den fruher beschriebenen Säureversuchen den höchsten Säuregrad aushielt, erweist sich auch hier am widerstandsfähigsten. Er war erst am siebenten Tage abgetötet.

2. Traubenzuckerbouillonkulturen. Ein etwas anderes Bild bieten die Traubenzuckerbouillonkulturen. Die Säuerung schreitet bei ihnen verhältnismäßig langsam vorwärts, wodurch den Organismen die Möglichkeit gegeben wird, sich besser an die Verhältnisse anzupassen. Bis zum neunten Tage bleiben alle Stämme mit Ausnahme des

Tabelle IV.

Mischkultur von *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien mit *B. cucumeris fermentati.*

Anlage des Versuches		Maische ohne Kreide; Ausgangs-$p_H = 5,5$		Traubenzuckerbouillon; Ausgangs-$p_H = 7,0$		Anlage des Versuches		Maische ohne Kreide; Ausgangs $p_H = 5,5$	Traubenzuckerbouillon; Ausgangs-$p_H = 7,0$
B. cucum ferm mit Stamm Nr.	Prüfung der Kultur nach Tagen	End-p_H	Zahl der *Coli*-Kolonien auf der Bouillonagarplatte	End-p_H	Zahl der *Coli*-Kolonien auf der Bouillonagarplatte	*B. cucum. ferm.*	Prüfung der Kultur nach Tagen	End-p_H	End-p_H
15	1	3,5	viele	5,0	sehr viele	allein	1	3,3	4,8
26	1	3,5	0	5,0	10	"	1	3,3	4,8
260	1	3,5	0	5,0	viele	"	1	3,3	4,8
307	1	3,5	viele	5,0	sehr viele	"	1	3,3	4,8
B. coli H.	1	3,5	viele	5,0	sehr viele	"	1	3,3	4,8
15	2	3,4	0	4,4	sehr viele	"	2	3,3	4,25
26	2	3,4	0	4,4	0	"	2	3,3	4,25
260	2	3,4	0	4,4	sehr viele	"	2	3,3	4,25
307	2	3,4	viele	4,4	sehr viele	"	2	3,3	4,25
B. coli H.	2	3,4	viele	4,4	viele	"	2	3,3	4,25
15	4	3,3	0	3.8	viele	"	4	3,3	3,8
26	4	3,3	0	3,8	0	"	4	3,3	3,8
260	4	3,3	0	3,8	viele	"	4	3,3	3,8
307	4	3,3	viele	3,8	sehr viele	"	4	3,3	3,8
B. coli H.	4	3,3	5	3,8	viele	"	4	3,3	3,8
15	5	3,3	0	3,8	4	"	5	3,3	3,8
26	5	3,3	0	3,8	0	"	5	3,3	3,8
260	5	3,3	0	3,8	9	"	5	3,3	3,8
307	5	3,3	10	3,8	viele	"	5	3,3	3,8
B. coli H.	5	3,3	0	3,8	10	"	5	3,3	3,8
15	7	3.2	0	3,7	0	"	7	3,2	3,7
26	7	3,2	0	3,7	0	"	7	3,2	3,7
260	7	3,2	0	3,7	0	"	7	3,2	3,7
307	7	3,2	0	3,7	5	"	7	3,2	3,7
B. coli H.	7	3,2	0	3,7	0	"	7	3,2	3,7

Stammes *26*, der sich früher schon als sehr empfindlich gegenüber Säuren gezeigt hatte, am Leben. Für diesen liegt die durch Milchsäuregärung hervorgerufene p_H-Grenze, die noch einigermaßen vertragen wird, ähnlich wie bei den früher beschriebenen Versuchen bei 5,0. Am zweiten Tage, an dem die Wasserstoffionenkonzentration bereits ein p_H von 4,4 erreicht hatte, wächst dieser Stamm auf den Kontrollplatten nicht mehr. In den 14 Tage alten Kulturen waren bis auf den typischen *Coli*-Stamm *307* alle *Coli*-Arten abgetötet worden. Die Widerstandsfähigkeit gegen Säure, die Stamm *307* stets auszeichnete, trat auch hier wieder klar zutage.

Wie schon erwähnt, hatten sich durch das langsamere Ansteigen des Säuregrades die Organismen in Traubenzuckerbouillon so weit den ungünstigen Verhältnissen angepaßt, daß sie auffallend lange Zeit lebensfähig blieben und ein p_H aushielten, das sie unter anderen Umständen nicht vertragen hätten. In Maische liegen die Verhältnisse deshalb ungünstiger, weil sie durch die Milchsäurebakterien schneller angesäuert wird. Auch fehlen hier die Eiweißabbauprodukte, die in der Bouillon neutralisierend und puffernd wirken. Eine Antibiose zwischen *B. coli* und Milchsäurebakterien, wie sie *O. Gratz* beschreibt, ist bei den Versuchen nicht beobachtet worden. Das frühere oder spätere Absterben der Versuchsstämme beruht vielmehr auf dem hohen Säuregrad, der in der Nährflüssigkeit schließlich erreicht wird.

Ob es möglich ist, die *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien allmählich an die gemeinsame Kultur mit den Milchsäurebakterien zu gewöhnen, ließ sich nicht nachweisen, da sie beim Umsetzen aus der angesäuerten Nährlösung in gewöhnliche Maische oder Traubenzuckerbouillon nicht mehr wuchsen. Schon nach 1 Tag waren sie durch die Milchsäurebakterien völlig unterdrückt worden.

II. Versuche mit Essigsäurebakterien.

a) Versuchsanordnung. Ein ähnlicher Versuch wie der vorangehende wurde auch mit *Essigsäurebakterien* angestellt. Als Erreger der Essigsäuregärung diente uns *Bacterium ascendens*, das sich in Bierwürze mit 2 % Alkohol schnell entwickelt und darin eine kräftige Essigsäurebildung hervorruft. Wie ein Vorversuch zeigte, vermehren sich auch die *Coli*-Stämme in dieser Nährlösung gut, so daß sie sehr geeignet für die Untersuchungen ist. Es wurden dieselben *Coli*- und *coli*ähnlichen Stämme wie vorher geprüft. Wegen des großen Sauerstoffbedürfnisses von *B. ascendens* kamen je 12 ccm Nährlösung in 100 ccm *Erlenmeyer*-Kölbchen, wodurch eine niedrige Flüssigkeitsschicht mit großer Oberfläche erzielt wurde. Die Beimpfung der Bierwürze mit den verschiedenen Organismen geschah in derselben Weise wie im Versuch mit Milchsäurebakterien.

b) Versuchsergebnisse. Tabelle V zeigt wiederum nur das Verhalten der *Coli*-Arten gegenüber der Säure, da sie in morphologischer

Tabelle V.

Mischkultur von *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien mit *B. ascendens*.

Anlage des Versuches		Würze mit 2% Alkohol; Ausgangs-p_H = 6,8		Anlage des Versuches		Würze mit 2% Alkohol; Ausgangs-p_H = 6,8
B. ascendens mit Stamm Nr.	Prüfung der Kultur nach Tagen	End-p_H	Zahl der *Coli*-Kolonien auf der Bouillonagarplatte	*B. ascendens*	Prüfung der Kultur nach Tagen	End-p_H
15	1	6,1	sehr viele	allein	1	6,0
26	1	6,1	0	„	1	6,0
260	1	6,1	viele	„	1	6,0
307	1	6,1	sehr viele	„	1	6,0
B. coli H.	1	6,1	„	„	1	6,0
15	2	5,6	„	„	2	5,6
26	2	5,6	0	„	2	5,6
260	2	5,6	viele	„	2	5,6
307	2	5,6	sehr viele	„	2	5,6
B coli H	2	5,6	10	„	2	5,6
15	3	4,7	19	„	3	4,5
26	3	4,7	0	„	3	4,5
260	3	4,7	3	„	3	4,5
307	3	4,7	21	„	3	4,5
B coli H.	3	4,7	0	„	3	4,5
15	4	3,9	0	„	4	3,9
26	4	3,9	0	„	4	3,9
260	4	3,9	0	„	4	3,9
307	4	3,9	0	„	4	3,9
B. coli H.	4	3,9	0	„	4	3,9

und physiologischer Beziehung keinerlei Veränderungen aufwiesen. Durch das langsame Ansteigen der Wasserstoffionenkonzentration infolge der Essigsäurebildung wird offenbar eine Anpassung der Stämme an höhere Säuregrade erreicht. Die unterste p_H-Grenze, bei der noch Keime der einzelnen Stämme auf den Bouillonagargußplatten auftraten, lag bei 4,7, also deutlich niedriger als in der mit Essigsäure versetzten Bouillon des ersten Versuches, in dem Wachstum nur bis zu einem p_H von 6,0 eingetreten war.

Auffallend ist, daß neben Stamm *26*, der bereits nach 24 Stunden unterdrückt wurde, der Vergleichsstamm *B. coli Haar* die geringste Widerstandskraft gegen Essigsäure aufwies. Er war schon am dritten Tage bei einem p_H der Nährlösung von 4,7 abgestorben, während die drei übrigen Stämme erst am vierten Tage, an dem der Säuregrad ein p_H von 3,7 bis 3,9 erreicht hatte, aus den Kulturen verschwunden waren.

Die Essigsäure wirkt, wie aus diesem Versuch wieder klar hervorgeht, schädlicher als die Milchsäure, von der erheblich höhere Säure-

grade vertragen wurden (Milchsäure: $p_H = 3{,}7$, Essigsäure: $p_H = 4{,}7$). Die Organismen halten sich außerdem in der Nährlösung mit der Milchsäuregärung länger als in der mit der Essigsäuregärung.

III. Schlußfolgerungen.

Es ist von praktischem Interesse, die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen mit der künstlichen und biologischen Ansäuerung der Nährflüssigkeit in Beziehung zu bringen zu den Vorgängen bei der Einsäuerung von Grünfutter. Wenn dem Futter zur Konservierung Säuren zugesetzt werden, gehen die *Coli*- und *coli*ähnlichen Keime, falls das p_H lange genug unter der Wachstumsgrenze (4,5) bleibt, mit Sicherheit zugrunde. Nimmt aber dieser Säuregrad infolge Absorption der Säuren durch die Pflanzenmasse zu schnell wieder ab, so genügt die kurze Einwirkung zur Vernichtung der schädlichen Organismen nicht, sondern wird erst durch die folgende Milchsäuregärung erreicht.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei der Einsäuerung von Futter ohne Säurezusatz. Hier geschieht die Unterdrückung der schädlichen Flora allein durch die auf biologischem Wege entstehende Säure. Der Vorgang dauert in diesem Falle etwas länger als beim Säurezusatz, da die Bakterien durch Anpassung einige Zeit sogar Säuregrade bis zu einem p_H von 3,3 aushalten. Je langsamer die Säuerung fortschreitet, um so weniger ist im allgemeinen damit zu rechnen, daß die *coli*ähnlichen Organismen aus dem Futter ganz verschwinden, selbst wenn verhältnismäßig hohe Säuregrade erreicht werden.

E. Zusammenfassung.

Untersuchungen über die Frage, bis zu welchem Säuregrad (p_H) die von grünen Pflanzen stammenden *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien in einer mit anorganischen oder organischen Säuren versetzten Bouillon noch wachsen, ergaben folgendes: Der höchste Säuregrad wurde von den Stämmen vertragen, die dem typischen *B. coli* nahe kommen oder identisch mit ihm sind. Je mehr sich der Organismus in seinen Eigenschaften von dem typischen *B. coli* entfernte, um so geringer war seine Widerstandskraft gegen den Einfluß der Säure.

Allgemein wirkten die Mineralsäuren weniger schädlich als die organischen Säuren, von denen nur Milchsäure eine gewisse Ausnahme machte. Salzsäure und Phosphorsäure, die bis zu einem p_H von 4,5 bis 5,0 vertragen wurden, hatten verhältnismäßig den geringsten Einfluß auf die Bakterien. Es folgten dann Milchsäure, Salpetersäure, Schwefelsäure und Weinsäure mit einer p_H-Grenze, die zwischen 5,0 und 5,5 lag. Daran schlossen sich Oxalsäure, Ameisensäure und Essigsäure, bei denen ein p_H von 5,5 bis 6,5 die unterste Wachstumsgrenze für die

Organismen darstellte. Die schädlichste Wirkung zeigte Buttersäure, die ein Teil der Stämme überhaupt nicht vertrug und ein anderer nur bis zu einem p_H von 6,0 bis 6,5.

Durch häufigeres Umsetzen gelang es in einigen Fällen, die Organismen an die ungünstige saure Nährlösung zu gewöhnen und die Wachstumsgrenze zu verschieben. Eine Veränderung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften durch den längeren Aufenthalt der Bakterien in der sauren Lösung konnte in keinem einzigen Fall beobachtet werden.

Die Grenze für die Lebensfähigkeit der *Coli*- und *coli*ähnlichen Bakterien in milchsaurer oder essigsaurer Lösung erhöhte sich beträchtlich, wenn die Säure durch Vergärung von Zucker oder Alkohol in der Nährflüssigkeit auf biologischem Wege erst entstand. Infolge des langsamen Ansteigens der Wasserstoffionenkonzentration trat eine Anpassung der Organismen an die ungünstigen Verhältnisse ein.

Die p_H-Grenze lag in Maische ohne Kreide bei 3,3, wenn in die Nährlösung als Erreger der Milchsäuregärung *B. cucumeris fermentati* neben *B. coli* geimpft wurde. Bei Benutzung von Traubenzuckerbouillon statt Maische betrug die p_H-Grenze 3,7. Da die Säuerung in der letztgenannten Lösung langsamer verlief, blieben die *coli*ähnlichen Organismen länger darin am Leben als in Maische. Für die Essigsäurebildung wurde *B. ascendens* in Bierwürze mit 2% Alkohol in flacher Schicht benutzt. In diesem Falle ließen sich die *Coli*-Arten noch nachweisen, nachdem die Wasserstoffionenkonzentration auf p_H 4,7 gestiegen war. Veränderungen morphologischer oder physiologischer Art konnten auch hier an den Bakterien nicht festgestellt werden.

Da den *coli*ähnlichen Bakterien als Schädlingen bei der Einsäuerung von Pflanzenmaterial große Bedeutung zukommt, sind die Ergebnisse über die Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegenüber den organischen und anorganischen Säuren auch für die Praxis von Wichtigkeit.

Dem Landwirtschaftsministerium sprechen wir auch an dieser Stelle unseren besten Dank für die Bewilligung von Mitteln zur Durchführung der Arbeit aus.

Literatur.

1) *G. Abraham*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **113**, 74, 1929. — 2) *A. Adam*, ebenda I. Orig. **87**, 481, 1922. — 3) *D. Bach*, C. r. de l'Academie des Sciences Paris **192**, 1680, 1932. — 4) *A. Beck* u. *I. Braun*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **127**, 132, 1932. — 5) *H. Braun* u. *C. Cahn-Bronner*, ebenda I. Orig. **86**, 203, 1921. — 6) *K. Brünn*, Inauguraldissertation, Berlin 1913. — 7) *C. E. Cahn-Bronner*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung, Orig. **33**, 214, 1921. — 8) *Cluset, R., Rochaix* u. *Kofman*, C. r. de l'Academie des Sciences Paris **178**, 20, 1924. — 9) *R. P. Cook* u. *R. S. Alcock*, Biochem. J. **25**, 523, 1931. — 10) *K. G. Dernby*, Ann. Inst. Pasteur **35**, 314, 1921. — 11) *K. G.*

Dernby u. *C. Näslund*, Biochem. Zeitschr. **182**, 393, 1922. — 12) *K. G. Dernby* u. *S. Siwe*, ebenda **182**, 412, 1922. — 13) *V. Dimitrýević-Speth*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **126**, 443, 1932. — 14) *E. Eichhoff* u. *W. Pfannenstiel*, zitiert nach *A. Beck* u. *I. Braun*, ebenda I. Orig. **86**, 203, 1921; Bruns Beitr. **151**, 171, 1931. — 15) *H. Grossmann*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **110**, 241, 1929, Beiheft. — 16) *O. Gratz*, Zeitschr. f. Gärungsphys. **1**, 256, 1912. — 17) *C. Hüttig*, Milchw. Forsch. **12**, 455, 1932. — 18) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II. **84**, 231, 1931. — 19) *K. Ishimori*, Zeitschr. f. Hyg. **102**, 333, 1924. — 20) *R. Koch*, Wochenschr. f. Brauerei **49**, Nr. 14/15, 110 u. 116, 1932. — 21) *M. Löweneck*, Centralbl. f. Bakt. II. **87**, 44, 1932. — 22) *H. Lotze*, ebenda I. Orig. **121**, 169, 1931. — 23) *L. Michaelis* u. *Marcora*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung **14**, 173, 1912. — 24) *K. Meyer*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **129**, 107, 1933. — 25) *R. P. Myers*, J. of Bact. **15**, 341, 1928. — 26) *G. Ruschmann* u. *W. Meyer*, Arch. f. Mikrobiol. **5**, 366, 1934. — 27) *E. Speyer*, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **93**, 340, 1924. — 28) *K. Scheer*, Zeitschr. f. Immunitätsforschung **33**, 40, 1921. — 29) *Derselbe*, Biochem. Zeitschr. **130**, 441 u. 447, 1922. — 30) *Derselbe*, Arch. f. Hyg. **88**, 130, 1919. — 31) *L. E. Walbun*, Biochem. Zeitschr. **130**, 28, 1922.

(Institut botanique de l'Université, Bern.)

Sur le facteur de croissance du germe de blé. Son extraction par l'acétate de plomb et son action sur un champignon.

Par

W. H. Schopfer.

Avec 1 figure dans le texte.

(Eingegangen am 20. August 1934.)

Au cours de nos recherches sur la culture en milieu synthétique de *Phycomyces blakesleeanus* (1930—1934) nous avons montré que sur divers milieux rigoureusement synthétiques, ce champignon ne pouvait pas se développer; la germination des spores est possible, mais les boyaux de germination ne se développent pas. (Milieu constitué par du maltose puriss., de l'asparagine, du sulfate de magnésium, du phosphate acide de potassium). A ce milieu, qui quantitativement est suffisant, il faut adjoindre un facteur de croissance qui, comme impureté, est joint à certains échantillons de maltose du commerce, obtenus par hydrolyse de la fécule de pomme de terre (1930); ce facteur a été retrouvé par nous dans la *levure*, les extraits alcooliques de *levure*. les extraits concentrés de *levure* (d'après la méthode d'*Osborne* et *Wakemann*, 1931—1932), dans le germe de blé (1932), dans les pollinies d'*Orchidées* (1934), dans le pollen d'un certain nombre de fleurs (1934). Il n'est pas identifié chimiquement; un grand nombre de substances connues, amines, acides aminés etc. ont été essayées; aucune ne peut se substituer à ce facteur de croissance. Celui-ci est thermostable, semble de nature azotée; il résiste aux alcalis et n'est pas détruit par les rayons ultra-violets; il est fortement adsorbé par le noir animal et faiblement par la terre à foulon; il passe au travers des ultra-filtres les plus fins.

De plus, *Phycomyces* est très sensible à l'influence des vitamines cristallisées pures B 1 et B 2 (1934)[1], plus fortement à celle de la B 1 qu'à celle de la B 2. Une quantité de 0,0005 γ de vitamine B 1 par ccm de milieu de culture suffit pour activer ce dernier et produire une récolte abondante

[1] Nous remercions vivement Messieurs les Professeurs *Windaus* et *Kuhn* de nous avoir fait parvenir des échantillons de leurs vitamines cristallisées.

alors qu'en son absence il ne se produit rien. Il ne semble pas que dans ces phénomènes, un électrolyte à l'état de trace et à action catalytique joue un rôle primaire. Dans un travail récent, *Wassink* (1934) confirme complètement nos résultats en ce qui concerne l'action d'un facteur thermostable. Il montre que sur divers milieux synthétiques, la culture de *Phycomyces* est impossible.

En nous basant sur les caractères de thermostabilité généralement admis (vitamine B 2 et bios beaucoup plus thermostables que la vitamine B 1) nous avions posé comme hypothèse de travail qu'il pourrait s'agir d'une substance de nature vitaminique, voisine de la vitamine B 1 ou du bios (au sens que l'on donne habituellement à ce terme) sans pour celà affirmer qu'il s'agisse avec certitude de l'une ou de l'autre de ces deux substances. A ce moment, nous n'avions pas de substances pures, cristallisées, mais seulement des extraits très concentrés qui sans aucun doute, contiennent plusieurs facteurs, même s'ils agissent à des doses très faibles (1 γ par ccm de milieu pour l'extrait concentré de *levure* qui contient surtout la vitamine B 2, un peu de B 1 et d'autres facteurs).

Dans une méthode, nous faisons à l'autoclave une extrait aqueux de germes; par l'alcool (dans lequel le facteur est soluble) et l'éther (dans lequel le facteur n'est que peu ou pas soluble) nous éliminons une grande partie des protides et des lipides. On peut également déféquer par l'acide trichloracétique et neutraliser (1934). A partir du filtrat concentré dans le vide (l'alcool étant évaporé) on peut par précipitation à l'aide de l'acide phosphotungstique et par décomposition du précipité par la baryte, concentrer le facteur actif et obtenir un liquide très actif, quoique très pauvre en résidu sec; dans l'extrait non traité, le résidu sec est de 18,2 %, après traitement par l'acide phosphotungstique il tombe à 0,24 % (1932).

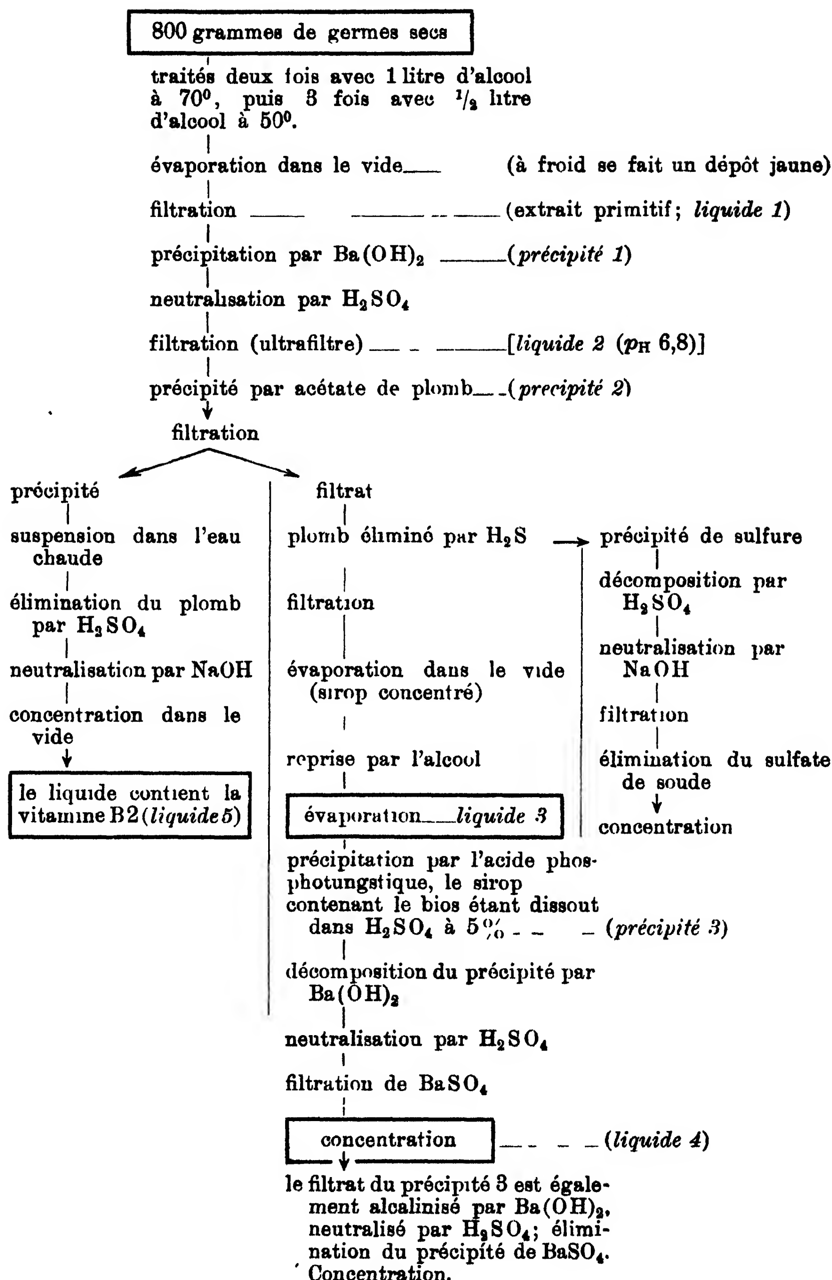
Une technique plus simple consiste à placer simplement les germes dans de l'eau à 0°; après quelques heures de dialyse, l'eau est fortement enrichie en facteur de croissance (1934).

En se basant sur une technique de *Narayanan* et *Drummond* (1930), qui sera décrite plus loin, *Wassink* indique qu'il peut séparer le facteur actif à partir de la levure et que la substance dont nous avons découvert l'action ne serait pas autre chose que le bios (cette conclusion étant liée à l'exactitude de la technique de *Narayanan* et *Drummond*). Cette technique est basée sur l'action de l'acétate de plomb qui précipite la vitamine B 2 (produit actif sur l'animal, mais pas sur la levure), tandis que le bios (actif sur la levure et pas sur l'animal) reste en solution.

Extraction du facteur de croissance à partir des germes de blé.

En partant des germes de blé nous avons utilisé cette technique, modifiée par *Wassink*. Les germes de blé sont absolument purs, privés de toute farine, semoule ou son (fournis par les minoteries de Genève-Plainpalais). La marche des opérations est la suivante:

Tableau I.


800 grammes de germes secs
traités deux fois avec 1 litre d'alcool à 70°, puis 3 fois avec ½ litre d'alcool à 50°.
évaporation dans le vide — (à froid se fait un dépôt jaune)
filtration — (extrait primitif; liquide 1)
précipitation par $Ba(OH)_2$ — (précipité 1)
neutralisation par H_2SO_4
filtration (ultrafiltre) — [liquide 2 (p_H 6,8)]
précipité par acétate de plomb — (précipité 2)
filtration
précipité
suspension dans l'eau chaude
élimination du plomb par H_2SO_4
neutralisation par NaOH
concentration dans le vide
le liquide contient la vitamine B2 (liquide 5)
filtrat
plomb éliminé par H_2S
précipité de sulfure
décomposition par H_2SO_4
neutralisation par NaOH
filtration
élimination du sulfate de soude
concentration
filtration
évaporation dans le vide (sirop concentré)
reprise par l'alcool
évaporation — liquide 3
précipitation par l'acide phosphotungstique, le sirop contenant le bios étant dissout dans H_2SO_4 à 5% — (précipité 3)
décomposition du précipité par $Ba(OH)_2$
neutralisation par H_2SO_4
filtration de $BaSO_4$
concentration — (liquide 4)
le filtrat du précipité 3 est également alcalinisé par $Ba(OH)_2$, neutralisé par H_2SO_4; élimination du précipité de $BaSO_4$. Concentration.

Nous en sommes resté au stade du sirop concentré, car le traitement par l'alcool redissout une grande partie du sirop et la précipitation par l'acide phosphotungstique ne semble pas enrichir notablement l'extrait en facteur actif.

En ce qui concerne la concentration de la vitamine B 2, les opérations ont été répétées une seconde fois afin d'éliminer du précipité toute trace de bios.

Le germe de blé contient un pigment soluble dans l'alcool, jaune citron vif. Par adjonction d'acide, il se décolore; après alcalinisation il redevient jaune vif.

Après précipitation par l'acétate de plomb, quoique le précipité ait entrainé une petite partie du pigment, le liquide reste jaune.

Lorsque le filtrat de ce précipité est traité par H_2S, afin d'éliminer le plomb, le liquide, primitivement fortement jaune, se décolore presque complètement; il semble que le pigment soit adsorbé par le précipité de sulfure. Pour observer si ce pigment possède aussi une activité comme facteur de croissance, nous l'avons libéré par décomposition du précipité de sulfure (traitement par H_2SO_4 et neutralisation par $NaOH$; élimination du sulfate de soude).

Le liquide contenant le facteur de croissance de microorganisme se présente comme un sirop brun, analogue à l'extrait de malt; le liquide contenant la vitamine B 2 est fluide, jaunâtre.

Le sirop brun est dissout dans 100 ccm d'eau, correspondant à 800 g de germes secs; $^1/_{10}$ de ccm de cet extrait correspond à 0,8 g de germes de blé.

Le liquide avec vitamine B 2 est ramené à 40 ccm; $^1/_{10}$ de ccm correspond à 0,2 g de germes de blé purs.

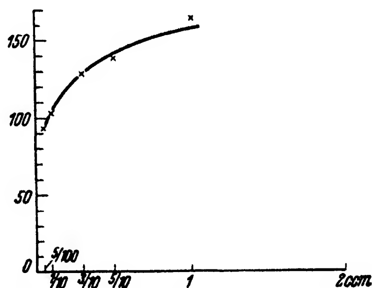


Fig 1
Production de matière sèche (en mg) en fonction de la teneur en extrait actif (en ccm)

Résultats obtenus.

Seuls sont essayés l'extrait primitif (liquide 1), le liquide final 3 contenant le bios et le liquide 5 contenant la vitamine B 2.

Phycomyces blakesleeanus Bgf., souches *Burgeff no. 1* [sexe(—)]. Poids de matière sèche après 7 jours, dans 30 ccm de liquide de *Coons* avec 10 % de glucose puriss., 1 ‰ d'asparagine puriss., 0,5 ‰ de sulfate de magnésium puriss. pro. anal., 1,5 ‰ de phosphate acide de potassium puriss. Les extraits sont ajoutés aux milieux et stérilisés avec lui, à 115° pendant 15 minutes (les deux facteurs sont thermostables). Culture en *Erlenmeyers* (verre d'Jena) de 100 ccm. (Voir tableau II et figure 1.).

Partout développement abondant du mycélium aérien avec de nombreux gros sporangiophores aériens et des sporanges noirs, mûrs et bien formés.

4 témoins sans facteur de croissance ne fournissent aucun développement (1 à 3 mg de matière sèche).

Tableau II.

	$^5/_{100}$ ccm mg	$^1/_{10}$ ccm mg	$^3/_{10}$ ccm mg	$^5/_{10}$ ccm mg	1 ccm mg	2 ccm mg
Extrait aqueux prim. Liquide 1	—	102	115	128	128	158
Précipité par l'acétate de plomb. Liquide 5	25	36	93	108	106	100
Non précipité par l'acétate de plomb. Liquide 3	94	104	129	139	165	118
Vitamine cristallisée	0,01	0,02	0,04	0,16 γ par ccm milieu		
B 1 (*Windaus*)	56	90	104	111		

Il semble donc bien que l'extrait aqueux qui est censé contenir le bios possède une haute activité, plus forte que celle de l'extrait aqueux primitif qui doit contenir la totalité des facteurs actifs. Par contre nous trouvons une activité non négligeable au précipité par l'acétate de plomb, devant contenir la vitamine B 2. Afin d'éliminer toute trace d'impureté (bios) nous effectuons une deuxième fois dans ce liquide une précipitation par l'acétate de plomb (tableau III). Après deux précipitations le développement est bien moindre, mais supérieur tout de même à celui que présente le témoin. Il se développe un faible mycélium aérien, alors qu'il n'en apparaît aucun dans le milieu contrôle.

Tableau III.

	Témoin mg	$^5/_{100}$ ccm mg	$^1/_{10}$ ccm mg	$^3/_{10}$ ccm mg	$^5/_{10}$ ccm mg	1 ccm mg	2 ccm mg
Après 1 précipit. . . .	0	39	64	94	99	90	67
Après 2 précipit. . . .	0	7	8	11	11	15	92

Influence des substances adsorbées par le précipité de sulfure de plomb (pigment) (tableau IV). Il y a un faible développement du mycelium aérien avec 1 et 2 ccm d'extrait. Il n'est pas impossible que cette influence soit due à une petite quantité de facteur de croissance adsorbé dans le milieu où se développe le précipité de sulfure de plomb. De toute façon, il ne semble pas que le pigment soit doué d'une activité particulière.

Tableau IV.

Témoin mg	$^1/_{10}$ ccm mg	$^5/_{10}$ ccm mg	1 ccm mg	2 ccm pour 30 ccm de milieu mg
0	8	20	36	48

On pourrait sur la base de ces résultats, affirmer que la vitamine B 2 n'a qu'une faible activité et que c'est le bios qui est responsable des faits observés. Cette conclusion qui est celle de *Wassink*, nous semble

prématurée, car au cours de toutes ces opérations, *il n'est jamais fait mention de la vitamine B 1* qui est également très répandue et qui se trouve dans le germe de blé et surtout la *levure*. Elle ne peut être détruite au cours des opérations que nous venons de décrire.

Ses propriétés, qui sont maintenant clairement établies sur la base des produits purs, cristallisés, obtenus par *Windaus* et ses collaborateurs, ne laissent aucun doute: elle est soluble dans l'eau et l'alcool aqueux; d'après divers auteurs, c'est dans l'alcool à 70^0 que sa solubilité est la plus grande; c'est précisément un alcool de ce titre qui est utilisé au départ. Elle est insoluble dans l'éther et le chloroforme; elle ne peut donc être entrainée par l'éther employé pour éliminer les lipides. Elle est adsorbée par le noir animal, ce que nous observons pour le facteur contenu dans le germe de blé: elle est également adsorbée par la terre à foulon d'où l'on peut pratiquer l'élution par la baryte (*Jansen* et *Donath*, *van Veen*). Ces procédés se retrouvent dans la technique que nous utilisons. Elle est précipitée quantitativement par l'acide phosphotungstique, ce que nous observons également pour le germe de blé dans notre technique primitive. Elle ne précipite pas par le nitrate d'argent, mais est précipitée par le chlorure de mercure en solution aqueuse et en présence de carbonate de sodium. *Elle n'est pas précipitée par l'acétate de plomb.* Cette dernière caractéristique montre clairement que la vitamine B 1 se retrouve dans le sirop final censé contenir le bios ainsi que dans le précipité final par l'acide phosphotungstique. D'autre part nous avons montré expérimentalement que la vitamine B 1 cristallisée (*Windaus*) est le produit qui est le plus actif sur *Phycomyces*. Il est donc indiscutable que la technique que nous avons appliquée, après *Narayanan*, *Drummond* et *Wassink* ne permet en aucun cas d'imputer au mystérieux bios les phénomènes observés par nous[1].

Si le bios existe réellement, il faudrait trouver une technique différentielle permettant, à partir des extraits finaux obtenus à l'aide de la méthode citée, de séparer la vitamine B 1, connue, du bios inconnu.

Les résultats obtenus avec la vitamine B 1 cristallisée de *Windaus* sont tels, les doses actives sont si faibles, qu'il est difficile de faire intervenir un impureté de second ordre jointe à ces cristaux. Parmi les caractéristiques de la vitamine B 1, observée avant la découverte de *Windaus*, sur des préparations impures, on a cité une adsorption possible par les sulfures de plomb et d'argent, par le sulfate de plomb et de baryum. Ces résultats sont inconstants et nous ne pensons pas qu'au cours de notre technique, ils puissent contribuer à faire disparaître la vitamine B 1 (le sulfate de plomb, de baryum, ainsi que le sulfure de plomb y interviennent).

---

[1] Pour les propriétés de la vitamine B 1 voir: *Windaus* (1931—1932) et *Simonnet* (1933).

Extraction du facteur de croissance à partir de la polissure de riz.

Nous avions déjà indiqué en 1932 que la polissure de riz fournit par simple traitement aqueux un facteur agissant sur le développement végétatif et sur les manifestations de la sexualité (formation des zygotes) de *Phycomyces* (cultures en boîtes de *Pétri*) (tableau V). Le mycélium aérien, à la surface de la culture est très développé; la ligne de zygotes est l'une des plus denses que l'on puisse obtenir, même comparée à un milieu naturel.

Tableau V.

a) Polissures non traitées, brutes.

10ème jour	Témoin	0,01 g	0,02 g	0,05 g
Zygotes	190	300	300	500 – 600

b) Extrait aqueux de polissures.

9ème jour	Témoin	$^1/_{10}$ ccm	$^1/_2$ ccm	1 ccm
Zygotes	65	215	1100 1200	1350

Or la polissure de riz a été la première source de vitamine B utilisée. Il existe dans le commerce une préparation très concentrée, faite à partie du riz, sous le nom d'Orypan (Société pour l'Industrie chimique Bâle). Cette préparation se présente comme un extrait de malt. Elle est obtenue de la manière suivante:

Extrait du riz traité par le réactif de *Llyod* [terre à foulon, soit silicate hydraté d'alumine et de magnésie; la vitamine B 1 est très facilement adsorbée par ce réactif (*Jansen* et *Donath*)]; élution par la baryte (*Jansen* et *Donath*, *van Veen*); précipitation par l'acide phosphotungstique; décomposition par la baryte; neutralisation. Cette technique est caractéristique pour la vitamine B 1. L'orypan renferme principalement les vitamines B 1 et B 2, ainsi que les vitamines B 4 et B 5, d'après les renseignements donnés par la Société pour l'industrie chimique, que nous remercions vivement.

Cette préparation s'est révélée très active sur *Phycomyces* (tableau 6).

Résultats obtenus. Poids en mg de matière sèche.

Tableau VI.

a) Solution contenant 0,10 g d'extrait sec pour cent (1000 γ par ccm).

Témoin	$^5/_{100}$ ccm	$^1/_{10}$ ccm	$^3/_{10}$ ccm	$^5/_{10}$ ccm	1 ccm	2 ccm
0	106	107	112	114	113	109

Avec $^5/_{100}$ de ccm soit 50 γ, soit 2 γ par ccm de milieu, il y action nette.

b) Solution contenant 0,01 g d'extrait sec pour cent (100 γ par ccm).

Témoin	$^5/_{100}$ ccm	$^1/_{10}$ ccm	$^5/_{10}$ ccm	1 ccm	2 ccm	4 ccm	8 ccm
0	24	36	64	69	70	70	70

Avec $^5/_{100}$ de ccm soit 5 γ, soit 0,2 γ par ccm de milieu, action nette.

Dans les deux essais, développement abondant du mycelium aérien. Malgré que cette préparation ne représente pas une substance pure, définie, son action se rapproche de celle de la vitamine B 1 cristallisée. Nous ne savons pas si ce produit contient un facteur de croissance particulier aux microorganismes; connaissant l'activité de la vitamine B 1 cristallisée, nous pouvons rapporter à cette dernière les phénomènes observés.

Les caractères de thermostabilité permettent-ils d'attribuer à la vitamine B 1 les phénomènes observés? On admet que la B 1 est la moins thermostable de toutes les vitamines B. Cependant la totalité de données relatives à ce caractère sont obtenues à l'aide de produits impurs, souvent même sur la matière première contenant la vitamine en question. Elles sont souvent contradictoires. D'autre part. dans un produit naturel, la vitamine est soit adsorbée, soit combinée à une autre substance. Sa résistance à la chaleur peut être très différente de celle que présente le produit pur. Il faut d'ailleurs distinguer entre l'action de la chaleur sèche et celle de la chaleur humide. *Sherman* et *Grose* obtiennent avec le jus de tomate les pourcentages suivants de destruction:

4 heures	à 100°. 20 %	à 120°. 47 %
	à 110°: 33 %	à 130°: 55 %

Une chaleur sèche (120°) n'a aucune action sur les graines, tandis qu'en milieu humide, la vitamine B contenue dans les graines est presqu'entièrement détruite après une heure (*Nietzescu*, 1923).

Nos milieux ne sont pas stérilisés à une température supérieure à 120°. Il est donc très improbable que la vitamine B 1 y soit *complètement* détruite. Nous n'observons presqu'aucune différence entre les expériences dans lesquelles la vitamine B 1 est stérilisée avec le milieu et celles où elle est ajoutée après la stérilisation. Un chauffage à 135° pendant 5 heures ne diminue que très peu l'action de la vitamine B 1 sur *Phycomyces*. Par contre un chauffage en milieu alcalin diminue l'activité de plus de 80 %.

Les caractères de thermostabilité ne peuvent donc nous empêcher d'attribuer tout ou partie des phénomènes observés dans nos cultures à l'action de la vitamine B 1.

Conclusions.

1. La technique basée sur l'action de l'acétate de plomb permet, à partir du germe de blé, de concentrer un facteur de croissance agissant avec intensité sur le développement de *Phycomyces* en milieu synthétique.

2. Cette technique ne permet pas d'attribuer au bios, non isolé, les phénomènes observés, la vitamine B 1 n'étant pas précipitée par l'acétate de plomb, et son action à l'état pur cristallisé étant connu.

3. La même action s'observe avec un extrait concentré de polissures de riz, après adsorption du facteur actif par la terre à foulon.

4. Nous ne savons pas si dans les extraits de levure, de germe de blé, de pollen, c'est réellement la vitamine B 1 seule qui agit et si elle est identique avec le facteur de croissance de microorganisme (facteur M) qui a fait l'objet des recherches précédentes. Même en ce qui concerne ce facteur aucune analogie certaine ne peut être établie avec le bios. Il n'est fait aucune allusion à une identité toujours possible entre la vitamine B 1 et le facteur de croissance de microorganisme de la nature du bios[1].

Bibliographie.

B. C. Jansen et *W. F. Donath*, Proceedings of the Royal Academy of Sciences, Amsterdam 1926, Mededeelingen van den Dienst der Volksgezondheit in Ned. Indie, part 1, 1927. — *B. T. Narayanan*, Biochem. J. **24**, 16, 1930. — *B. T. Narayanan* et *J. C. Drummond*, Biochem. J. **24**, 19, 1930. — *J. J. Nietzescu*, C. R. Soc. biol. Paris **89**, 1245, 1923. — *W. H. Schopfer*, C. R. Soc. physique hist. nat. Genève **47**, 165, 1930. — *Idem*, Actes Soc. helv. Scien. nat. 1930, p. 312. — *Idem*, Bull. Soc. bot. suisse **40**, 87, 1931; **41**, 73, 1932. — *Idem*, C. R. Soc. physique hist. nat. Genève **49**, 70, 1932. — *Idem*, Bull. Soc. bot. suisse **41**, 335, 1932. — *Idem*, C. R. Soc. physique hist. nat. Genève **51**, 26, 1934. — *Idem*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **52**, 308, 1934. — *Idem*, C. R. Soc. physique hist. nat. Genève **51**, 29, 1934. — *H. C. Sherman* et *M. R. Grose*, J. Amer. chem. Soc. **47**, 2728, 1923. — *H. Simonnet*, Les Vitamines B, Zeitschr. f. Vitaminforsch. **2**, 28 et 94, 1933. — *van Veen*, Rec. trav. chim. Pays-Bas **49**, 1178, 1930. — *Idem*, Chem. Zeitschr. **1**, 1126, 1931. — *E. C. Wassink*, Rec. Trav. bot. néerl. **31**, 583, 1934. — *A. Windaus*, *R. Tschesche*, *F. Laquer*, *H. Ruhkopf* u. *F. Schultz*, Nachr. v. d. Gesell. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. 1931, p. 207; H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. **204**, 123, 1932. — *A. Windaus*, *R. Tschesche*, *H. Ruhkopf*, Nachr. v. d. Gesell. Wiss. Göttingen 1932, p. 342.

[1] Tous les métaux qui interviennent au cours de nos techniques (baryum, plomb) dont on peut supposer que des traces seraient présentes dans les produits finaux, ont été essayés seuls. Ils n'ont aucune action positive.

(De l'Institut botanique de l'Université de Bern.)

Les vitamines cristallisées B comme hormones de croissance chez un microorganisme (Phycomyces).

Par

W. H. Schopfer.

Avec 12 figures dans le texte.

(Eingegangen am 13. September 1934.)

I. Introduction.

Définition du facteur de croissance.

La culture d'un microorganisme en milieu défini nécessite la présence d'une quantité suffisante d'aliments: d'une part il faut des matières organiques carbonées et azotées indispensables pour l'élaboration de la matière vivante et pour la production d'énergie, d'autre part des sels minéraux agissant généralement à faibles doses.

Ces éléments constituent des aliments proprement dits, indispensables pour couvrir les besoins plastiques et énergétiques du microorganisme. Ces substances agissent quantitativement.

Il est possible, dans certains cas très favorables, d'établir un bilan matériel et un bilan d'énergie. Un bilan d'azote par exemple doit indiquer une égalité parfaite entre la quantité d'azote offerte par le milieu d'une part et, d'autre part, l'azote emmagasiné par l'organisme et celui qui reste dans la culture. Un tel bilan s'établit avec une précision satisfaisante si l'on songe que l'erreur est de moins de 1% (*Terroine* chez *Aspergillus Oryzae*).

Le même bilan peut être établi en ce qui concerne l'énergie et ses échanges (avec certaines corrections).

Connaissant le coefficient d'utilisation de l'organisme considéré pour une substance définie, connaissant d'autre part le rendement énergétique (les conditions physiques externes étant constantes), on peut dire que toute modification apportée au milieu a pour résultat un changement prévisible dans le poids de matière vivante produite et dans l'énergie que cette dernière renferme. Les lois les plus générales de la physiologie comparée s'appliquent aux microorganismes.

Si par contre une substance, connue ou non, ajoutée au milieu en quantité infinitésimale (comparée aux aliments ordinaires) déclanche un effet qui est sans rapport avec sa quantité et, pour ainsi dire, imprévisible, sans relation avec la loi d'action de masse, nous avons un *facteur de croissance*. Cette substance ne doit pas intervenir directement dans le métabolisme du champignon; sa quantité est trop petite pour que

l'on puisse admettre une action plastique ou énergétique. Elle ne peut intervenir que pour régler l'assimilation des substances banales qui sans elle ne sont pas ou mal assimilées. La caractéristique fondamentale d'un tel facteur est qu'il agit à dose très petite.

Une définition théorique de ce genre englobe tous les facteurs de croissance proprement dits en les assimilant à des substances vitaminiques. Remarquons que le terme envisagé dans son sens le plus large peut aussi bien s'appliquer à des substances minérales (ions métalliques à action catalytique), aux ions d'hydrogène qu'aux substances organiques; cependant le terme de facteur de croissance au sens strict est le plus souvent appliqué à des substances organiques.

C'est un phénomène de ce genre que nous avons observé chez une Mucorinée, *Phycomyces blakesleeanus*. Sur un milieu rigoureusement synthétique constitué par des substances absolument pures, ce champignon ne se développe pas du tout, même avec un ensemencement massif (plusieurs millions de spores). Les germinations peuvent se produire, mais le développement ne progresse pas; il se forme tout au plus quelques flocons submergés en milieu liquide (poids sec de quelques milligrammes); en milieu solide agarisé, il apparaît un mycélium de surface très clairsemé; les gros sporangiophores aériens ne se forment pas ou tout au moins restent très clairsemés, avec de rares sporanges bien formés. De même il ne se forme aucune zygote malgré le contact de deux mycéliums de surface (+) et (—).

Milieux utilisés.

Un grand nombre de milieux ont été essayés, mais sans succès.

Milieu de *Coons* modifié: Glucose (ou autre glucide) 10%; Asparagine 1‰; Sulfate de magnésie 0,5‰; Phosphate acide de potasse 1,5‰.

Milieu de *Nielsen* (utilisé pour les facteurs de croissance chez *Aspergillus*): Glucose 10%; Tartrate d'ammonium 10‰; Sulfate de magnésie 0,5‰; Phosphate acide de potasse 0,5‰; Chlorure de fer à 1%, 10 gouttes.

Milieu de *Raulin* acide et neutre selon les formules classiques. Le sucre est représenté par du saccharose pur.

Le milieu de *Raulin* à base de sucre candi donne d'excellents résultats; il ne constitue pas un milieu synthétique rigoureux, car il contient diverses impuretés qui fonctionnent comme facteurs de croissance [*Schopfer* (20)].

Avec un mélange défini d'acides aminés, ou un peu d'urée, ou mieux encore un peu de peptone, on améliore la culture sans jamais atteindre le développement observé sur un milieu naturel. *Neumann* avait déjà observé qu'une dose d'azote organique de 0,00005% sous forme de peptone ou d'urée permet le développement en milieu artificiel à partir d'une seule cellule de *levure*. Les peptones ne constituant pas des substances chimiquement définiès, il n'est pas impossible qu'elles contiennent un facteur de croissance, bios ou autre; cette hypothèse a déjà été envisagée.

Il est intéressant de constater que les substances du milieu de *Raulin* telles que le fer, le zinc, le silicium, qui agissent comme accélératrices de croissance chez *Aspergillus*, sont ici sans action.

Si, par contre, au milieu synthétique, est adjoint un facteur de croissance présent dans la *levure*, dans les extraits alcooliques de levure, dans les extraits concentrés de levures, dans les germes de blé, dans les pollinies d'*Orchidées* et dans le pollen de diverses fleurs ainsi que dans l'urine, [*Schopfer* (15, 16, 18, 19)] on observe un développement extrêmement intense, tout spécialement avec le germe de blé et avec la levure. Ce facteur se trouve joint également à certains échantillons du maltose du commerce, considérés comme purs. Il s'agit réellement d'un facteur de croissance, car il agit encore à l'état de trace. Un extrait concentré de levure, entièrement soluble dans l'eau agit à la dose de 1 γ par ccm de milieu de culture. Cet extrait est loin de représenter une substance pure; on peut donc concevoir un poids de substance active encore beaucoup plus faible.

L'action favorisante s'exerce aussi bien sur le développement végétatif que sur la formation des zygotes.

Si, dans le milieu considéré comme synthétique, on emploie le maltose de *Kahlbaum*, les résultats sont excellents, tant en ce qui concerne le développement végétatif que les manifestations de la sexualité. Si l'on mélange le maltose de *Kahlbaum* avec un autre échantillon de maltose inactif, de façon que le poids total soit toujours de 10 g % on observe un développement d'autant meilleur que la proportion de maltose *Kahlbaum* est plus élevée [*Schopfer* (14) (15)].

Nature du facteur de croissance.

Cette substance ne fut pas isolée. En ce qui concerne le maltose de *Kahlbaum*, nous avons supposé qu'elle pourrait provenir de la *levure* que l'on ajoute parfois à la fécule de pomme de terre afin de rendre l'hydrolyse plus complète; nous ignorons si la fabrique *Kahlbaum* utilise ce procédé; le fait est que seul le produit de cette maison présente une activité particulière. On peut par plusieurs cristallisations débarrasser ce sucre de sa substance active. *Les cendres sont sans action.*

Cette substance semble de nature azotée; elle est hydrosoluble, soluble également dans l'alcool aqueux et semble-t-il dans l'alcool absolu (à partir du germe). Elle passe au travers des ultrafiltres les plus fins (Membranfilter-Gesellschaft), elle est fortement thermostable et alcali-stable; elle résiste à l'action des rayons ultra-violets; elle est fortement adsorbée par le noir animal (*Merck*), faiblement par la terre à foulon. Malgré tous les essais de concentration, nous n'avons pas obtenu de produit cristallisé; il est donc impossible de tirer des conclusions en ce qui concerne la nature chimique de cette substance ainsi que sa parenté possible avec d'autres facteurs de croissance.

En se basant sur la nature du matériel de départ, nous avons supposé que notre facteur pourrait se rapprocher soit du „bios" au sens classique du mot soit de la vitamine B 2 (on ne connaît aucun exemple certain de l'action de cette dernière sur un végétal), sans pour celà affirmer qu'il puisse s'agir avec certitude de l'une ou l'autre de ces

substances; les caractères de thermostabilité (le bios et la vitamine B 2 sont, d'après les renseignements que nous donnent tous les traités de vitaminologie, plus thermostables que la vitamine B 1), permettent de faire cette supposition. D'autre part, les données généralement admises en ce qui concerne l'adsorbtion par la terre à foulon plaident également en faveur de cette hypothèse. D'après *Randoin*, la vitamine B 1, B 2 et le bios (vitamine d'utilisation cellulaire) sont de moins en moins adsorbés par la terre à foulon. Or, notre substance l'est justement très peu. Elle n'est également pas adsorbée par la terre d'infusoires.

Procédés d'extraction.

Les procédés d'extraction utilisés ont été les suivants: a) Simple extraction aqueuse, obtention d'un extrait grossier. b) Extraction aqueuse, puis traitement à l'alcool et à l'éther pour éliminer une grande partie des protides et des lipides. c) Même traitement, avec en plus une précipitation par l'acide phosphotungstique et une décomposition du précipité par la baryte. d) Traitement complexe permettant de séparer la vitamine B 2 du bios, selon *Narayanan* et *Drumond*, et selon *Wassink* (technique modifiée par ce dernier) (*Schopfer*, 24, 1934). Il intervient au cours de cette technique une précipitation par l'acétate de plomb. Cette dernière nous permet de dire que l'un au moins des facteurs actifs dans le développement de *Phycomyces* n'est pas précipité par l'acétate de plomb. Nous avons montré que cette technique ne permet pas, avec certitude, de rapporter au bios les phénomènes observés chez *Phycomyces*.

Notre matériel de départ est habituellement constitué par du germe de blé pur.

En partant de la polissure de riz on obtient également un facteur très actif (Orypan du commerce, CIBA, Bâle) intervenant à la dose de 0,2 γ par ccm de milieu de culture. A la base de cette préparation se trouve un traitement par la terre à foulon qui adsorbe le facteur actif, suivi d'une élution par la baryte et d'une précipitation par l'acide phosphotungstique. Cette méthode est utilisée en vue de la préparation d'un concentré de vitamines B.

Disons encore que l'action catalytique d'une substance minérale a été très soigneusement examinée: une telle substance ne semble pas devoir intervenir *tout au moins d'une manière primaire*.

L'hypothèse de départ est donc la suivante: existence d'un facteur de croissance activant le développement de *Phycomyces*, de nature organique; action analogue à celle du „bios", possibilité de l'existence de plusieurs facteurs actifs. Etant donné que le matériel de départ est celui que l'on utilise souvent pour la préparation des vitamines proprement dites (B) est-il possible de faire intervenir ces dernières pour expliquer les phénomènes observés? Est-il possible de négliger la notion toujours discutée de bios?

II. Etude de l'action des vitamines cristallisées B 1 et B 2.

Jusqu'à maintenant les préparations de vitamines B n'ont jamais pu être considérées comme pures; l'existence de plusieurs facteurs empêche toute conclusion certaine. *Orr-Ewing* et *Reader* (9), p. ex. indiquent

que la vitamine B 1 a une action sur *Streptothrix corallinus*. La préparation utilisée est celle de *Kinnersley* et *Peters*. *Reader* (10) trouve un facteur de croissance pour cet organisme dans le glucose impur ce qui n'est pas le cas pour nous, dans le sérum, dans l'extrait brut de glande thyroïde; *la levure et le germe de blé n'ont qu'une faible action*, le glucose pur et l'extrait pur de thyroïde n'ont pas d'action.

La première préparation de *Jansen* et *Donath* n'est pas pure également. Grâce à l'obligeance des professeurs *Windaus* (Göttingen) et *Kuhn* (Heidelberg) que nous remercions vivement, nous avons obtenu une petite quantité de vitamines B 1 et B 2 *cristallisées pures* qui nous ont permis d'effectuer tous nos essais. Pour les caractères chimiques de ces vitamines nous renvoyons aux travaux originaux ainsi qu'au résumé de *Simonnet* (25)[1].

A. Caractéristiques de ces vitamines.

Vitamine B 1 (*Windaus*). Obtenue à partir de la *levure*. Adsorbtion par la terre à foulon, élimination des corps étrangers par le sulfate de mercure, le nitrate d'argent, ou par benzoïlation. L'extrait brut concentré est traité par le chlorure d'or; le sel d'or de vitamine est dissous dans l'eau, décomposé par l'hydrogène sulfuré; le sulfite d'or est filtré, le filtrat est traité par l'acide picrolonique ce qui livre un précipité cristallin. Le picrolonate a la formule $C_{12}H_{16}N_4OS$, le chlorure: $C_{12}H_{18}O_2N_4S$. Le fait nouveau est que cette substance contient non seulement de l'azote ce qui est admis pour la vitamine B 1, mais du soufre. Point de fusion du picrolonate: 229°, du chlorhydrate, avec lequel nous avons travaillé: 245°.

Les caractères de précipitation et de solubilité ont été établis définitivement: solubilité dans l'eau et l'alcool aqueux, insolubilité dans l'éther, le chloroforme et le benzol. Adsorption par la terre à foulon. Précipitation par l'acide phosphotungstique, non précipitation par le nitrate d'argent, le sulfate de mercure en solution acide, précipitation par le chlorure de mercure en présence de carbonate de soude; à l'état pur, non précipité par l'acide picrique; *non précipité par l'acétate de plomb*.

Activité des divers produits obtenus jusqu'à aujourd'hui:

	dose par jour et par pigeon γ
Jansen, *Kinnersley*, *Peters* et *Reader*	7—9
Guha	12—24
Kinnersley et *Peters*	12
Williams, *Watermann* et *Gurin*	40
Odake	20—50
Windaus et collab.	2,4

[1] En 1933, nous avons, sur sa demande, envoyé à Monsieur *Burgeff*, des échantillons de nos extraits, dont il désirait étudier l'action sur la germination des graînes d'*Orchidées*. Dans la suite, Monsieur *Burgeff* nous a signalé l'existence des vitamines cristallisées B 1 et B 2 récemment isolées; il nous a indiqué (29. 1. 34) qu'en accord avec nos théories, elles exerçaient une action nette sur *Phycomyces*. Je lui suis reconnaissant de m'avoir

La préparation de *Windaus* (30) est donc la plus pure et la plus active que l'on ait obtenue jusqu'à aujourd'hui. Pour la comparaison avec les produits des autres auteurs, voir *Windaus* (31). C'est cette préparation qui, dissoute dans l'eau distillée, est utilisée avec *Phycomyces*.

Vitamine B 2 (*Kuhn*). Dès 1933, *Kuhn*, *György* et *Wagner-Jauregg*(1 à 5) signalent l'existence d'une nouvelle classe de colorants, les flavines, qu'ils retirent en particulier du lait (lactoflavine) et de l'albumine d'oeuf (ovoflavine). Par adsorbtion à partir du lait avec de la terre à foulon, élution dans un mélange de pyridine, d'alcool méthylique et d'eau distillée, on obtient une solution contenant les flavines; l'alcool méthylique est éliminé, la solution est traitée par l'éther, l'acétone; du filtrat, on retire le colorant par adsorbtion avec de la franconite. La lactoflavine est retirée de l'adsorbat par élution (pyridine, alcool méthylique). Le produit de l'élution est concentré dans le vide, traité avec 2 ccm d'acide acétique glacial et 1000 ccm d'acétone; le précipité incolore qui se forme est éliminé par centrifugation. La solution concentrée est traitée par l'acide picrique saturé ce qui produit la précipitation de la créatinine et d'autres substances accompagnant les colorants. L'acide picrique est éliminé par l'éther dans l'obscurité. Par concentration de la solution restante dans le vide, il se forme un dépôt cristallin, purifié 3 fois par cristallisation dans l'acide acétique 2 n bouillant (rendement 6 mg pour 300 litres de crême). Le produit obtenu a un point de fusion de 267° (corr. 271°); formule globale $C_{17}H_{20}N_4O_6$.

Cette lactoflavine est fortement fluorescente et sensible à la lumière. Elle est caractérisée par un potentiel d'oxydoréduction négatif très marqué (à p_H 7 = — 0,20 volt); ce caractère joint à des caractères de constitution semble déterminer la nature vitaminique de la lactoflavine.

Cette substance est utilisée dans nos cultures en solution aqueuse.

Toutes les expériences sont effectuées en milieu de *Coons* (sauf indication contraire): Glucose puriss. 10 %; asparagine 1 °/₀₀; sulfate de magnésium puriss. 0,5 °/₀₀; phosphate acide de potassium 1,5 °/₀₀. *Erlenmeyers* en verre d'Jena de 100 ou 200 ccm avec 25 à 40 ccm de milieu. Sauf avis contraire, stérilisation à 115° pendant 15 minutes. A ces milieux sont ajoutées les solutions de vitamines, stérilisées ou non avec le milieu. Température d'expérience: 18—20°. Lumière du jour.

B. Action des vitamines sur la formation des zygotes.

Expérience 1. Milieux naturels témoins (voir fig. 1 et 2).

Tableau I.

	témoin *Coons*	témoin malt 1 °/₀
développement végétatif	0	60 mg abondante formation de gros sporangiophores verts
formation des zygotes	0 faible myc. de surface	large ligne de zygotes; plus de 1000; myc. aérien très développé

donné l'occasion de vérifier l'exactitude de mes hypothèses en ce qui concerne l'action d'un facteur de croissance du groupe des vitamines B. Il reste à prouver si c'est là bien le seul facteur actif ce qui, comme nous l'avons précédemment indiqué, n'est pas certain.



Fig 1.
Développement végétatif.
Témoins: 1: Milieu de *Coons* sans vitamine. 5: Milieu naturel, malt 1 %.

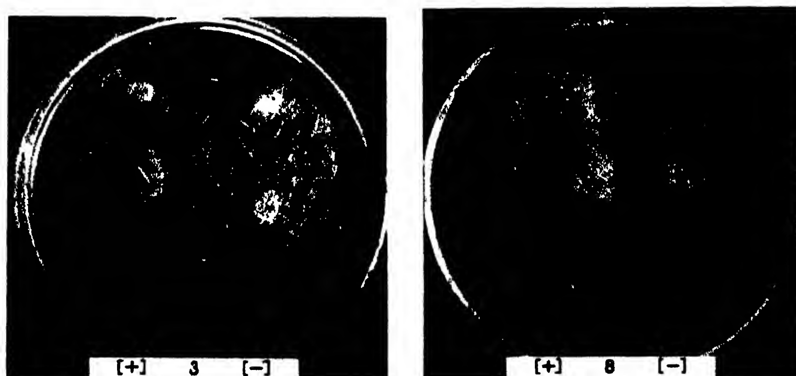


Fig 2.
Formation des zygotes.
Témoins: 3: Milieu de *Coons* sans vitamine. 8: Milieu naturel, malt 1 %.

Expérience 2. Milieu de Coons solide avec 3% d'agar. Souches *Burgeff* 10 (+), 17 (−).

Vitamine B 1 ajoutée à froid après stérilisation. 2, 10, 20, 40 γ par 20 ccm de milieu. Après 7 jours abondant développement du mycélium aérien; contact entre les mycéliums des deux sexes; large ligne de zygotes jaunes. Beaucoup de zygotes noires bien formées (voir fig. 3).

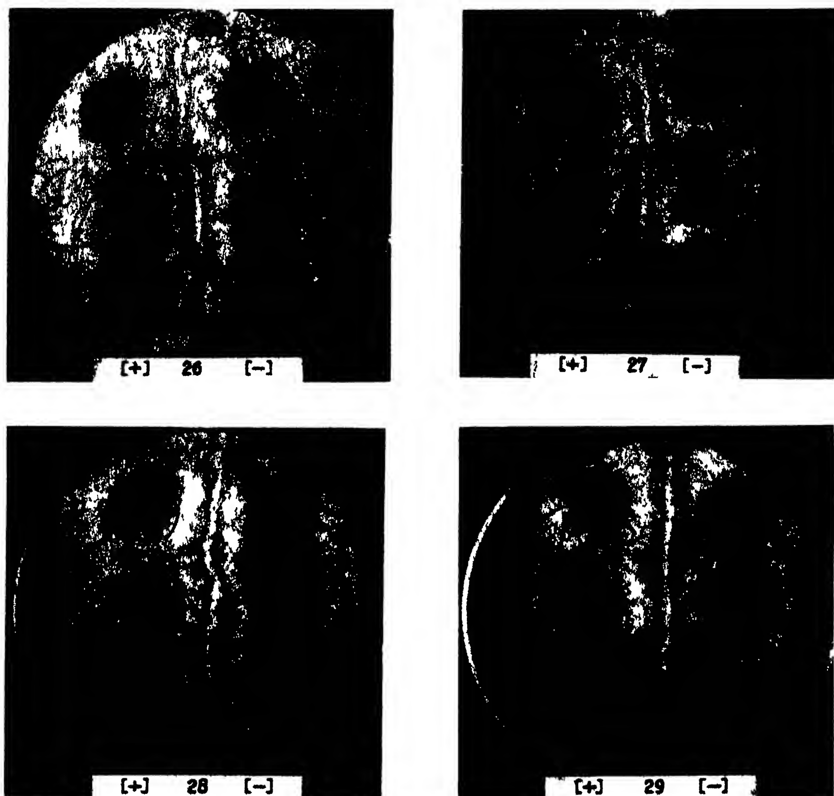


Fig. 3.
Formation des zygotes.
Milieu de *Coons* avec vitamine B 1: 26 27 28 29
0,05 0,5 1 2 γ par ccm de milieu

Vitamine B 2 stérilisée avec le milieu. Mêmes quantités que pour l'expérience précédente et mêmes résultats. Pas de différence dans le développement du mycélium aérien et dans la formation des zygotes. (voir fig. 4.)

Expérience 3.

Vitamine B 2 ajoutée à froid après stérilisation: 2, 10, 20, 40γ pour 20 ccm de milieu. Après 7 jours, abondante formation de mycélium aérien. Ligne de zygotes bien formées, nombreuses zygotes jaunes. Peu de différences entre les divers termes de l'expérience.

Expérience 4.

Vitamine B 2 stérilisée avec le milieu. Mêmes résultats qu'avec l'expérience précédente. Avec 2 γ, le développement est un peu plus faible. Avec toutes les autres doses il est égal. Il est aussi fort, si ce n'est plus, que

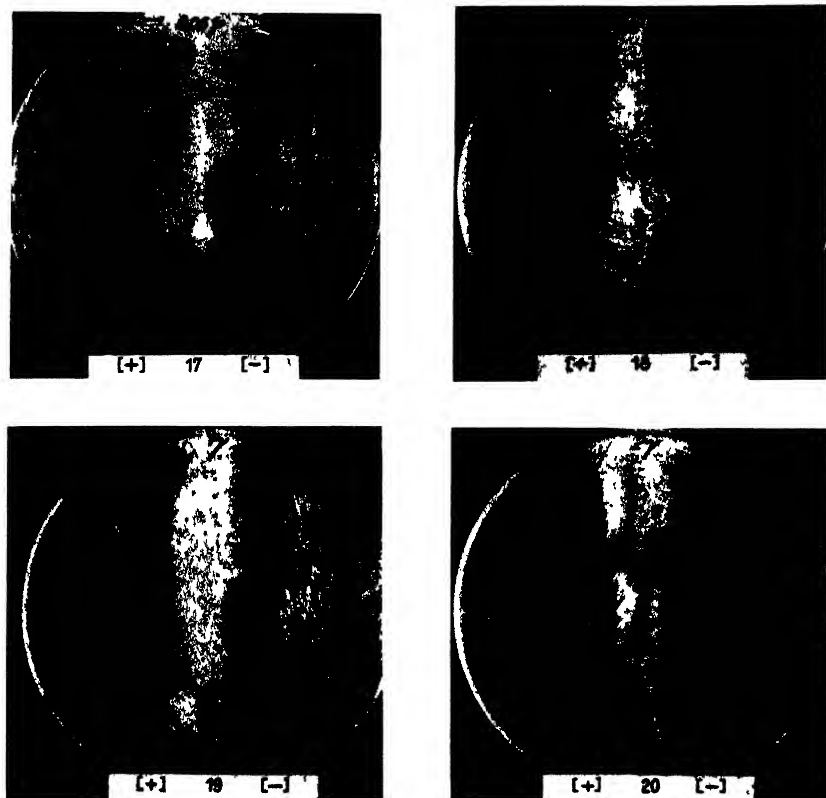


Fig 4
Formation des zygotes

Milieu de *Coons* avec vitamine B 2	17	18	19	20
	0,05	0,5	1	2 γ par ccm de milieu

sur un bon milieu naturel. Les milieux contenant la vitamine B 2 en quantité suffisante prennent la teinte jaune de cette dernière; elle ne disparaît pas par la stérilisation.

La conclusion est que les vitamines B 1 et B 2 ont sur des milieux solides une action favorisante extrêmement intense. Sans elles, il ne se produit rien sur de tels milieux. Les phénomènes observés sont identiques à ceux que l'on remarque en utilisant le germe de blé et la *levure* (extraits).

C. Développement végétatif.

Expérience 5. Contrôle général.

Vitamine B 1 stérilisée avec le milieu:

2 γ	pour 30 ccm de milieu:	128, 123, 99	mg de matière sèche
10 γ	„ 30 „ „	91, 102, 103	„ „ „ „

Vitamine B 2 stérilisée avec le milieu:

2 γ pour 30 ccm de milieu:	55,	39,	40 mg de matière sèche
10 γ „ 30 „ „ „	118,	117,	95 „ „ „ „

Les deux vitamines exercent donc, malgré leur dose très faible, une action intense; celle de la B 1 est plus forte que celle de la B 2.

Expérience 6. Doses variables de B 1 et B 2; influence de la stérilisation.

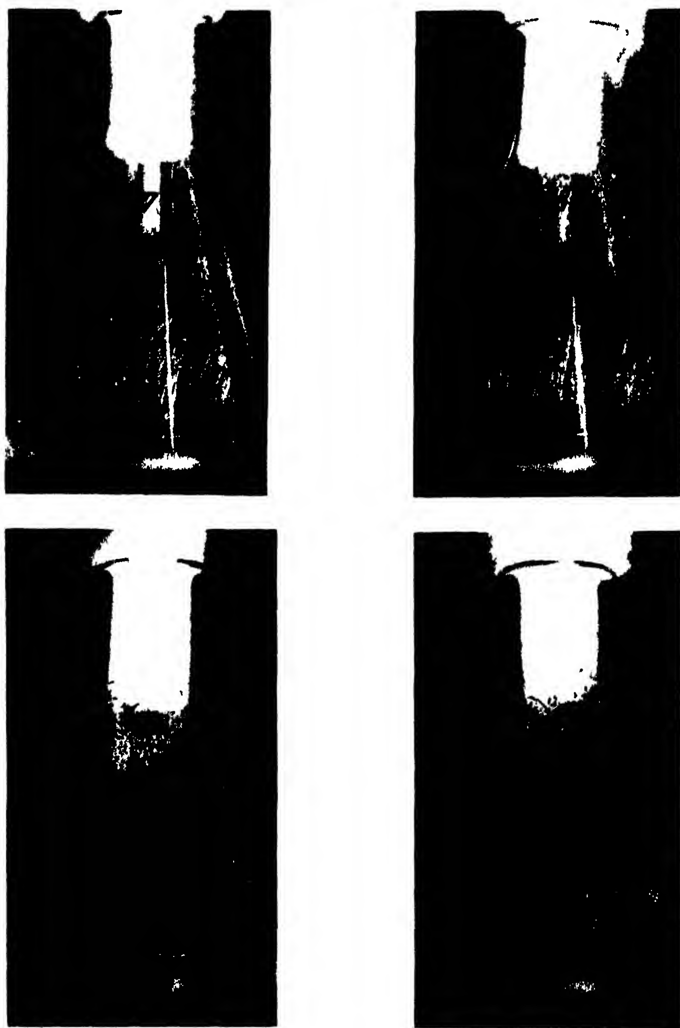


Fig 5. Developpement végétatif.

Milieu de *Coons* avec vitamine B 1	17	18	19	20
	0,05	0,5	1	2 γ par ccm de milieu

Tableau II. Vitamine B 1.

Vitamine B 1, γ pour 40 ccm de milieu	temoin	2	10	20	40	80
stérilisée avec le milieu après 20 jours	0	154	168	150	153	154 mg
non stérilisée avec le milieu après 25 jours	0	162	159	139	141 mg	perdu

(voir fig. 5 et 12)

Tableau III. Vitamine B 2.

Vitamine B 1, γ pour 40 ccm de milieu	témoin	2	20	40	80
stérilisée avec le milieu après 15 jours . .	0	49	74	78	83 mg
non stérilisée avec le milieu après 15 jours	0	59	75	79	79 mg

(voir fig. 6)

Il n'y a pas de différence sensible entre les deux groupes d'expériences.

Pas de différence sensible entre les deux groupes d'expériences. Activité nettement plus faible (plus de 50%) de la vitamine B 2.

Dans toutes les expériences faites jusqu'à maintenant, le développement végétatif est extrêmement luxuriant; les gros sporangiophores verts, indice d'une culture bien nourrie et s'effectuant dans de bonnes conditions, sont très abondants; les sporanges noirs et bien formés ne manquent pas. Leur volume semble plus élevé que dans les meilleures cultures faites sur milieu naturel (plus grand nombre de spores ?). De même, dans la croûte qui se forme à la surface et sur laquelle s'élèvent les sporangiophores aériens, le pigment de nature carotinoïde que nous avons étudié chez les *Mucorinées* se forme avec intensité. Les hyphes sont bourrées de globules gras de couleur jaune citron vif. Ce pigment apparaît aussi dans les sporangiophores, à leur extrémité surtout, alors que le sporange n'est pas formé; la même couleur s'observe dans le sporange jeune. Plus tard, le sporange forme un pigment noir et la membrane du sporangiophore forme un pigment vert soluble dans l'eau (il n'est présent que dans les hyphes aériennes ayant une respiration normale); le pigment jaune est alors beaucoup moins visible. Vers le haut du sporangiophore, le pigment de membrane est moins abondant et la couleur jaune encore visible. Toutes ces manifestations nous ont paru, sur ces milieux synthétiques additionnés de traces de vitamine B 1 et B 2, aussi marquées, si ce n'est plus, que sur le meilleur milieu naturel (malt, ovomaltine), ou, exprimé différemment, il faut un milieu naturel très concentré pour obtenir des manifestations d'une égale intensité.

Expérience 7. Détermination d'une limite inférieure d'action. Dans les expériences précédentes, surtout avec la vitamine B 1, on n'observe aucune différence en passant de 2 à 80 γ pour 40 ccm de milieu de culture. Celà laisse supposer que la limite inférieure est située beaucoup plus bas. Ce n'est pas le cas pour la vitamine B 2.

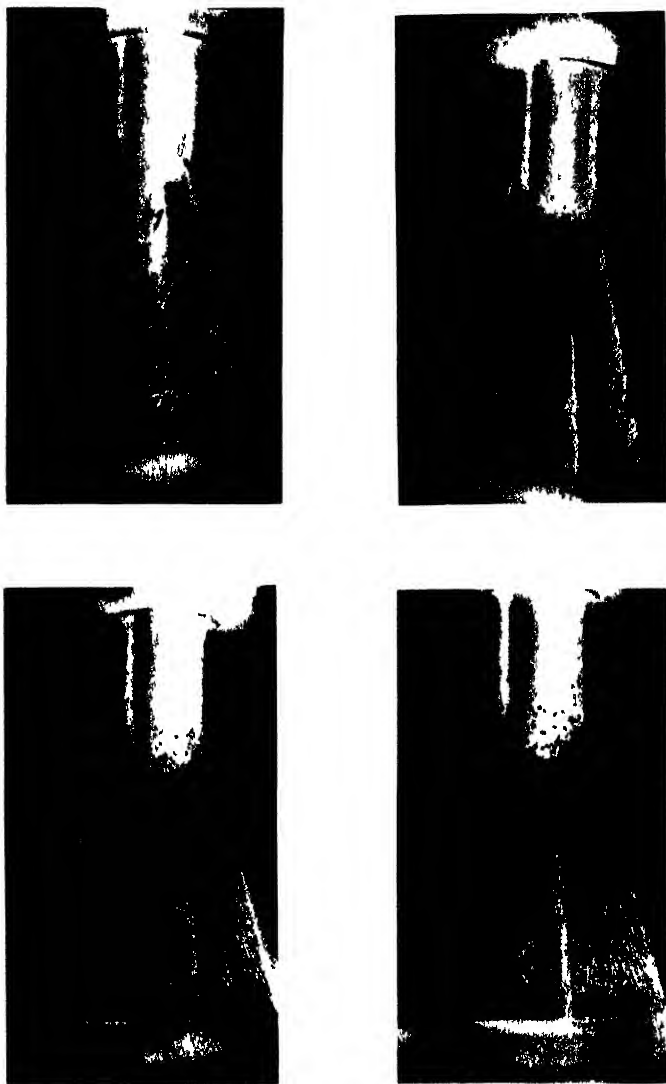


Fig 6.
Développement végétatif

Milieu de *Coons* avec vitamine B 2.	21	22	23	24
	0,05	0,5	1	2 γ par ccm de milieu.

La solution de vitamine initiale contient 20 γ par ccm de solution. Nous effectuons à partir de cette solution deux dilutions successives de telle sorte qu'un ccm correspond à 2 puis à 0,2 γ.

Vitamine B 1 stérilisée avec le milieu.

Tableau IV.

	0,2	0,6	1	2	4	10	20 γ
	pour 40 ccm de milieu						
après 9 jours . . .	74	102	116	116	105	113	117 mg

L'émersion va croissant de même que le nombre des sporangiophores. Nous observons ici un développement plus faible avec une dose moindre de vitamine; on ne peut encore parler de limite inférieure. (voir fig. 11.)

Tableau V.

	0,02	0,06	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6 γ
	pour 40 ccm de milieu						
après 15 jours . .	8	28	51	81	106	111	95 mg

Ici nous avons atteint la limite inférieure, sans discussion possible. Le témoin sans vitamine fournissant tout au plus 1 à 2 mg de matière sèche, on peut dire que la dose de 0,02 γ pour 40 ccm de milieu soit 0,0005 γ par ccm de milieu, suffit pour activer ce dernier et le faire différer du témoin. A partir de 0,1 γ soit 0,0025 γ par ccm de milieu, le développement devient normal et l'on ne peut plus guère distinguer la culture en milieu synthétique de celle qui s'est développée sur un milieu naturel. (voir fig. 10.)

Vitamine B 2 stérilisée avec le milieu.

Tableau VI.

	0,2	0,6	1	2	4	10	20 γ
	pour 40 ccm de milieu						
après 9 jours . . .	33	49	83	70	91	113	123 mg
	émersion croissante du mycélium aérien						

La limite inférieure est visible et, pour des doses identiques à celle de la vitamine B 1, beaucoup plus nettement marquée.

Tableau VII.

	témoin	0,02	0,06	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6 γ
	pour 40 ccm de milieu							
après 15 jours . .	0	?	3	10	—	15	22	34 mg

Nous pouvons dire maintenant avec certitude que la limite d'action de la vitamine B 2 est notablement supérieure à celle de la B 1 (0,02 γ pour la B 1, 0,1 γ pour la B 2).

Pour diverses raisons, les expériences qui suivront ont été effectuées avec la vitamine B 1 seule. (voir note finale.)

Expérience 8. Influence du nombre de spores inoculées.

Les inoculations des milieux se font avec une suspension de spores fraiches dans de l'eau courante. Pour rendre l'expérience plus précise, nous mesurons souvent à l'aide d'une chambre à compter (*Zeiss-Thoma*) le nombre de spores inoculées. La suspension est obtenue par agitation dans l'eau d'un fragment de mycélium. Nous vérifions au microscope si la suspension ne contient réellement que des spores et si les fragments de hyphes ne sont pas trop abondants, auquel cas la suspension est rejetée. De toute façon, il est impossible de prévoir pour toutes les séries d'expériences, qui se font à des moments différents, des inoculations identiques. Nous ne nous préoccupons que d'obtenir l'inoculation massive. On peut se demander si des différences trop accentuées et imprévisibles entre les différentes inoculations ne pourraient pas constituer une cause d'erreur.

1 goutte correspond à 0,175 ccm; $^1/_{1000}$ ccm correspond à 1900 spores environ. 1 goutte contient 332500 spores.

Tableau VIII.

nombre de gouttes	1	2	3	4	5	6	10 γ
sans vitamine B 1	0	0	0	6	13	13	7 mg
avec 10 γ B 1 pour 40 ccm de milieu	148	166	161	154	163	142	152 „
	partout émersion semblable						

Dans l'expérience sans vitamine, aucune émersion nulle part. Dans les limites observées, il n'y a aucune différence sensible, malgré que la quantité de spores ensemencées passe de 1 à 10. Ces quantités sont celles qui se retrouvent constamment dans nos expériences.

L'inoculation massive est indispensable pour que les cultures soient comparables. La plus grande partie des spores germent; il se forme un abondant mycélium submergé et bientôt, par imbrication du mycélium de surface, une croûte plus ou moins dense apparaît; elle recouvre toute la surface du milieu liquide; sur cette croûte se dressent les sporangiophores aériens.

Si l'ensemencement est par trop parcimonieux, il ne se forme qu'un flocon submergé diffus, l'émersion se fait par place, irrégulièrement; tantôt la croûte recouvre toute la surface, tantôt elle ne se forme qu'en un seul point; à un même moment, les cultures ne sont pas comparables en ce qui concerne les poids de matière vivante produite, tandis qu'elles le sont si l'on effectue l'ensemencement massif. Ce point de détail est très important pour une étude quantitative et ne doit pas être négligé lors des vérifications. Les courbes que l'on obtient dans ce cas sont régulières et possèdent une signification. Il faut également s'appliquer à obtenir des conditions extérieures, physiques, aussi constantes que possible, car on connait la plasticité des microorganismes et leur sensi-

bilité aux agents externes. Malgré celà il est bien difficile d'obtenir une constance absolue entre les diverses séries d'expériences exécutées à des moments différents; il existe des conditions intrinsèques, imprévisibles: nature, vitalité, âge de la souche utilisée pour l'inoculation, qui troublent l'expérience et empêchent d'atteindre le degré de précision désiré. Autant que possible, les souches de départ sont de même âge, de même sexe et produites sur le même milieu naturel.

Nous avons renoncé à l'inoculation par petit bloc d'agar sur lequel un mycélium de surface s'est développé. La technique semble plus précise, mais au fond ne l'est pas. On saute ainsi le premier stade, celui de la germination et il n'est pas certain que les résultats obtenus par les deux méthodes soient comparables. D'autre part, le mycélium qui s'est développé à la surface du milieu peut déjà avoir produit des substances particulières qui ont diffusé dans le bloc d'agar et peuvent troubler l'expérience. Lorsqu'on est obligé de travailler avec des doses de substances aussi minimes que celles que nous utilisons, il est indispensable de réduire au minimum les causes d'erreur prévisibles, si faibles soient-elles.

Il est également important de prévoir non seulement une quantité de milieu constante pour une série d'expériences, mais aussi une hauteur de milieu constante; la rapidité de développement, à un moment donné, est fonction de la hauteur et de la vitesse avec laquelle le mycélium immergé atteint la surface et peut produire ses hyphes aériennes. Des expériences faites avec des quantités identiques de milieu, mais de hauteurs différentes, ne sont pas comparables à un moment donné. Ce point est important également, car des *Erlenmeyers* de même contenance, provenant de la même fabrique, peuvent n'avoir pas exactement la même forme, surtout à leur base; avec des quantités semblables de milieu, la hauteur atteinte dans le flacon sera différente et la courbe obtenue sans signification.

Expérience 9. Influence de la dose de glucose sur l'activité de la vitamine B 1. On peut se demander si avec des doses très faibles ou très fortes de sucre, *Phycomyces* est capable de se développer sans vitamine B 1 et si avec des doses de sucre variables, l'action de cette dernière reste constante. La vitamine est stérilisée avec le milieu.

Tableau IX.

dose de glucose	0	1	2	4	6	8	10	12 %
sans vitamine . . .	0	0	0	0	0	0	0	0 mg
avec 20 γ B 1 pour 30 ccm de milieu .	0	124	134	131	122	153	199	167 „
idem	0	110	112	126	158	166	179	195 „
total	0	234	246	257	280	309	378	362 „

Tableau X.

dose de glucose	0	1	2	4	8	16	32 %
sans vitamine	0	0	0	0	0	0	0 mg
avec 1 ccm aq. dist. . . .	0	0	0	0	0	0	0 „
avec 20 γ B1 pour 30 ccm de milieu	0	119	142	156	204	222	161 „

Il n'existe donc pas, dans les conditions de nos expériences et avec le glucose, de condition telle que le champignon puisse se développer sans vitamine B 1. Avec toutes les doses de sucre utilisées, la vitamine agit. Avec les fortes concentrations (32 %), le champignon se développe moins bien. *Sans sucre, la vitamine B 1 n'agit pas.*

Dans tous les cas le mycélium aérien est bien développé.

Expérience 10. Influence de la dose d'asparagine sur l'activité de la vitamine B 1. Pour beaucoup de *Mucorinées* — le fait a été observé par nous avec *Mucor hiemalis* — l'asparagine, lorsqu'on élève sa dose, exerce très rapidement une action inhibitrice sur le développement. De quelle manière cette action se manifeste-t-elle lorsque la vitamine B 1 est présente en quantité suffisante? L'inhibition en question avait été observée sur un milieu à base de maltose *Kahlbaum*, donc en présence d'une substance active.

Tableau XI.

dose d'asparagine	0	0,1	0,2	0,3	0,5	1	2	4 ‰
sans vitamine . .	0	0	0	0	0	0	0	0 mg
avec 20 γ B1 pour 30 ccm de milieu	0	37	42	65	115	193	416	597 „

Sans vitamine, il ne se forme que quelques flocons submergés; peu de différence entre les divers termes de l'expérience.

Avec vitamine et en présence d'une dose élevée d'asparagine, nous obtenons le meilleur développement que nous ayons observé au cours de toutes nos expériences, sur plus de 2200 cultures. A partir de 1 ‰ il se forme une croûte superficielle extrêmement dense.

L'asparagine règle d'une façon beaucoup plus précise que le sucre le développement de la culture. Il semble donc que non seulement l'assimilation de l'élément carboné, mais encore celle de l'azote est favorisée par la vitamine B 1.

Il serait intéressant de rechercher ce qui se passe lorsqu'on fait varier ensemble l'azote et le sucre (ainsi que la dose de vitamine). Le coefficient économique doit certainement être modifié.

Nous avons travaillé avec de l'asparagine pure. On a signalé (*Richards*) que certains échantillons d'asparagine contenaient des traces de thallium (décelé spectroscopiquement) et que sur les *levures*, ce métal à l'état de trace, pouvait agir comme le „bios". Nous avons

montré que le thallium employé en milieu synthétique n'exerçait aucune action (*Schopfer*, 1932). Nous ne savons pas si en présence d'une substance active (vitamine B 1) il peut jouer le rôle de co-facteur de croissance. Etant donné le prodigieux développement de sporangiophores, observé avec ces doses d'asparagine, cette hypothèse peut se justifier.

Expérience 11. Variation qualitative de la source carbonée. La question se pose de savoir si en présence de glucose seul la vitamine B 1 manifeste son action ou si on peut encore l'observer avec d'autres glucides (et dérivés).

Tableau XII.

		conc. %	ccm milieu	sans vitamine	avec 20 γ B 1
pentoses	arabinose	5	25	M. S.	67 mg M. A.
	xylose	10	25	0	69 „ „
hexoses	glucose	10	25	0	75 „ „
	lévulose	10	25	0	169 „ „
	galactose	10	25	0	79 „ „
	(tétracétate de galactose)		25	0	0
	mannose	10	25	0	77 mg M. A.
diholosides	saccharose	10	25	0	81 „ „
	maltose	10	25	0	110 „ „
	lactose	10	25	0	3—4 mg M. S.
	cellobiose	5	25	0	88 mg M. A.
triholosides	raffinose	5	25	24 M. A.	44 „ „
polyholosides	inuline ord.	5	25	M. A.	M. A.
	inuline puriss.	5	25	0	70 mg M. A.
	dextrine	5	25	M. A.	M. A.
	amidon	0,5	30	M. S.	35 mg M. A.
méthyl-pentose	rhamnose	10	25	0	78 „ „
cycloses	inosite	1,25	25	faible myc. submergé	M. S.
	hexaphosphate d'inosite sel de Na		25	0	0
	idem sel de Ca Mg		25	bon développement subm.	M. S.
alcools polyatomiques	glycérine	5	30	M. S.	46 mg M. A.
	érythrite	5	30	0	0
	pentaérythrite	5	30	0	0
	mannite	10	25	0	76 mg M. A.
glucosides	α méthylglucoside	2,5	25	0	0
	β méthylglucoside	2,5	25	0	M. S.

M. A. = mycélium aérien bien développé;
M. S. = mycélium submergé bien développé, sans hyphes aériennes.

Les expériences ne sont pas comparables entre elles, car la quantité de sucre n'est pas partout la même. Celà suffit pourtant pour observer qu'en présence de vitamine B 1, *Phycomyces* est capable de se développer sur des substrats carbonés très divers.

Les hexaphosphates d'inosite sont peu solubles dans l'eau; nous mettons dans le milieu la substance en excès; la stérilisation à 120° en dissout une petite quantité, non déterminée. L'adjonction de vitamine B 1 ne produit aucune accélération avec le sel de Ca et Mg de l'hexophosphate d'inosite.

La dextrine blanche semble pouvoir être utilisée en présence de B 1, mais la dextrine jaune ne donne lieu à aucun développement.

L'inuline ordinaire contient un facteur de croissance; l'inuline très pure n'en contient pas et est activée par la vitamine B 1. Il en est de même

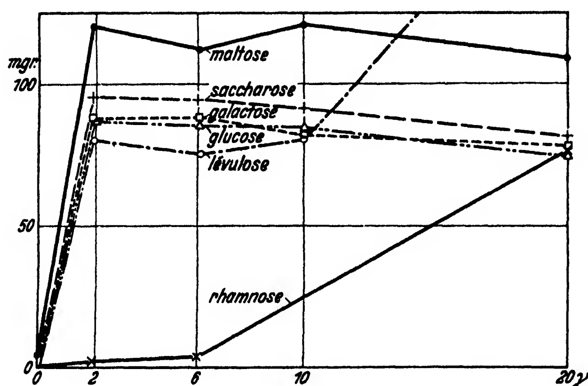


Fig. 7.
Action de la vitamine B 1, à doses variable, en présence de divers glucides (pour 30 ccm de milieu.)

pour le raffinose du commerce qui comme le maltose qui est à la base de nos recherches, donne lieu, sans facteur de croissance ajouté, à un faible développement. L'arabinose semble également agir faiblement sans vitamine.

Le fait que le lactose n'est pas assimilé même avec une dose élevée de facteur de croissance, est très intéressant.

Le méthylglucoside α n'est pas assimilé, mais en présence de facteur de croissance le méthylglucoside β semble l'être faiblement.

En résumé, nous constatons que sur la presque totalité des substances carbonées utilisées, le champignon ne se développe pas sans vitamine B 1 et qu'avec adjonction de cette dernière la plus grande partie des substances peuvent être assimilées. Les phénomènes observés ne sont donc pas liés spécifiquement au glucose ou au maltose.

En faisant varier la dose de vitamine nous observons avec les sucres courants des variations de développement analogues à celles qui ont été trouvées lors de l'utilisation du glucose (voir figure 7). Avec l'amidon de pomme de terre, (réaction de *Fehling* négative) les

variations de la quantité de vitamine B 1 ajoutée ne donnent pas lieu à des différences marquées de développement: 34 mg avec 2 γ pour 25 ccm de milieu, 36 mg avec 20 γ. L'amidon semble dans les conditions de nos expériences, faiblement assimilé, le mycélium aérien est pauvre.

Pour l'action des tartrates voir exp. 19.

Expérience 12. Variation qualitative de la source azotée. Il faut démontrer si, comme source azotée, seule l'asparagine donne lieu aux manifestations observées.

Dans deux essais, l'asparagine est remplacée par du glycocolle et du nitrate d'ammonium, en quantité isoazotée avec les doses habituelles d'asparagine.

Glycocolle	0,23	0,56	1,12	2,24 °/₀₀
Nitrate d'ammonium	0,12	0,30	0,61	1,22 °/₀₀
Ces quantités correspondent aux doses suivantes d'asparagine	0,2	0,5	1	2 °/₀₀

Quantité de milieu 30 ccm; 20 γ vitamine B 1 (figure 8).

La courbe montre qu'avec le glycocolle, le poids de matière sèche, 218 mg (avec le maximum d'azote) est plus élevé que celui que l'on peut obtenir dans n'importe quel milieu naturel. Le glycocolle est tout aussi bien assimilé que l'asparagine. Par contre, le nitrate d'ammonium l'est moins bien, malgré que la culture soit encore appréciable. Avec ce sel, le pigment carotinoïde se forme abondemment. Les acides aminés suivants[1] ont été essayés (en proportion isoazotée avec l'asparagine 1 °/₀₀) dans 20 ccm de milieu.

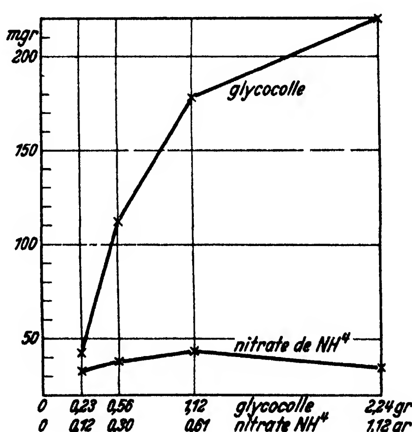


Fig. 8.
Action de la vitamine B 1 en presence de diverses sources d'azote variable (20 γ B 1 pour 30 ccm de milieu).

Il est intéressant d'observer que l'arginine produit un excellent développement avec formation d'une croûte dense. L'utilisation de la leucine est en relation avec son activité optique: la d-leucine est bien assimilée, la l-leucine mal.

Le problème du mélange de divers acides n'a pas été étudié en détail, car il sort du cadre de cette étude. Plusieurs auteurs [*Williams*

[1] Obligeamment fournis par la maison *Hoffmann-La Roche* que nous remercions vivement.

Tableau XIII.

	sans vitamine	avec vit. B1
d-alanine	0	18 mg M. A.
l-leucine	0	14 mg M. A. faible
d-leucine	0	47 mg M. A. bien développé
tyrosine	0	0*
sérine	0	76 mg M. A.
cystine	0	M. S.
acide glutamique	0	44 mg M. A.
arginine	0	135 mg „
lysine	0	0*
ornithine	0	0*
d-l-proline	0	75 mg M. A.
oxyproline	0	34 mg „
glycyl-glycine	0	M. S. faible
mélange	0	„ „

Le mélange est constitué par de la cystine, de la proline, de la lysine, de la valine, du tryptophane ainsi que de la glycyl-glycine.
M. A. = mycélium aérien bien développé;
M. S. = mycélium submergé seul;
0 = pas de développement ou développement très faible (1—3 mg);
* = quelques petits grumeaux jaune vif, qui ne se développent pas et qui n'atteignent pas la dimension d'un flocon submergé ordinaire.

et *Honn* (29)] ont signalé que sur certaines *Mucorinées* un mélange déterminé exerce une action stimulante, sans cependant fournir le développement que l'on observe avec facteur de croissance.

De toute façon dans nos essais 8 acides aminés au moins sont bien assimilés en présence de vitamine B 1, alors qu'en son absence ils ne pouvent l'être.

Les peptones, qui ne sont pas des corps chimiquement définis, n'ont pas d'intérêt pour nous. On sait qu'ils apportent pour divers champignons et bactéries des facteurs de croissance très actifs.

Dans son étude sur les caractères sexuels secondaires d'ordre chimique, *Wesendonck* (28) reprenant nos premières observations, cherche en vain une source azotée qui lui permette d'obtenir un bon développement en milieu synthétique (sans facteur de croissance, le problème n'étant pas encore posé). Il n'obtient aucun résultat avec le sulfate d'ammonium, l'asparagine, le glycocolle, l'urée, l'acide hippurique, le nucléinate de sodium et d'autres substances, ce qui confirme entièrement nos observations actuelles et ce qui ne pouvait pas alors être expliqué. Par contre, en employant de la peptone *Witte*, la croissance se produit (en présence de saccharose); cet auteur obtient alors un poids de 22,4 mg qui est encore bien faible comparé à nos résultats. Le fait s'explique en faisant intervenir les substances actives contenues dans la peptone. Tout le problème du dimorphisme sexuel biochimique devrait maintenant être repris sur de nouvelles bases.

Expérience 13. Influence de la température sur l'action de la vitamine B 1.

Tableau XIV.

témoin	4	10	20	40 γ de B1 pour 30 ccm de milieu
		A. A 28° C et obscurité:		
0	92	92	96 mg	perdu
		B. A 20° C et lumière:		
0	115	115	134	124 mg

A 28° le mycélium est beaucoup moins développé en hauteur; il forme un buisson ramassé. A 20° le développement est normal avec de nombreux sporangiophores aériens bien formés.

La température de 18—20° C semble constituer un optimum dans les conditions de nos expériences et avec les quantités de vitamine B 1 utilisées.

Toutes nos expériences ont été effectuées dans une limite de température de 17—21° C.

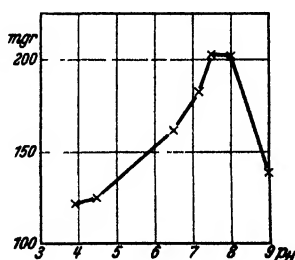


Fig. 9.
Influence du p_H sur l'activité de la vitamine B 1. (10 γ pour 30 ccm de milieu.)

Expérience 14. Influence de la concentration en ions hydrogène sur l'activité de la vitamine B 1. Dans des limites de p_H de 3 à 9 c'est aux environs de la neutralité que l'action de la vitamine se fait le mieux sentir (voir figure 9). Remarquons qu'avec aucun des p_H utilisés, *Phycomyces* ne peut se développer sans facteur de croissance.

Expérience 15. Influence de l'obscurité et de diverses radiations sur l'activité de la vitamine B 1.

Tableau XV.

	4	6	10	20 γ de B 1 pour 30 ccm de milieu
lumière continue	122	125	135	142 mg
obscurité complète . . .	—	189	160	—

Après 7 jours, les formes cultivées à la lumière présentent leurs caractères habituels. Le pigment carotinoïde est extrêmement abondant dans les sporanges et les hyphes.

Dans les formes cultivées à l'obscurité le mycélium aérien est plus élevé, mais pas plus dense. L'obscurité semble donc favoriser chez ce champignon la croissance en hauteur; de même le poids de matière vivante formée est notablement plus élevé. Par contre, *absence presque complète de pigment jaune.* Seul le pigment de membrane vert s'est bien formé.

Tableau XVI.

	témoin	2	6	10	20 γ de vitamine B 1 pour 30 ccm de milieu
lumière ord. . .	0	105	103	110	105 mg
obscurité . . .	4	110	112	—	110 „
rouge	4	128	140	138	133 „

A la lumière développement et pigment normaux. A l'obscurité et à la lumière rouge, développement plus rapide en hauteur, moins de sporangiophores formés. *Absence presque complète de pigment jaune.*

Tableau XVII.

	témoin	2	10	20 γ de vitamine B 2 pour 30 ccm de milieu
lumière	0	62	112	112 mg
obscurité	4	70	115	119 „
rouge	4	86	169	123 „

Même remarque que pour la vitamine B 1.

Ces observations concordent avec les données déjà anciennes de *Lendner* (6) qui, avec beaucoup de *Mucorinées*, observe que dans l'obscurité et à la lumière rouge, les sporangiophores sont plus longs et plus grêles. En plus il ressort de nos expériences que le poids de matière obtenue est supérieur; selon l'usage nous pourrions dire que l'assimilation est favorisée, mais mieux que l'action du facteur de croissance est amplifiée.

En effectuant des cultures en lumière violette et bleue, nous observons, avec les deux vitamines B, un développement du mycélium intermédiaire entre celui que l'on obtient à l'obscurité et celui qui est produit à la lumière . *Le pigment jaune se forme abondamment.*

Expérience 15. Influence de la hauteur du milieu sur le développement et l'action de la vitamine B 1. Dans une culture normale, le champignon forme d'abord un mycélium submergé qui vit dans un milieu pauvre en oxygène. Sur la croûte formée s'élèvent les sporangiophores qui ont une respiration normale. La vitesse de développement de la culture dépend de la rapidité avec laquelle le mycélium atteint la surface du liquide. Nous nous sommes demandé si en utilisant une hauteur très faible de liquide, on ne pourrait pas obliger le mycélium aérien à se développer sans facteur de croissance.

Tableau XVIII.

hauteur du milieu.	5	8	12	16 mm
sans vitamine	0	0	0	0
avec 10 γ B 1 pour 25 ccm milieu	18	48	86	70 mg

En aucun cas il ne se produit de hyphes aériennes sans facteur de croissance. Un milieu très mince, avec un contact presque direct avec

l'air ne suffit pas à induire la croissance et les tropismes qui, chez *Phycomyces*, conduisent les sporanges à s'élever sur le milieu submergé.

La vitesse d'émersion est fonction de la hauteur de la culture. Avec 5 mm de hauteur l'émersion complète avec arrêt de développement se produit déjà le 4ème jour. Avec 16 mm de hauteur, après 15 jours, l'émersion complète ne s'est pas encore produite.

Avec 5 mm de hauteur c. à. d. très peu de liquide, il ne se forme aucun des gros sporangiophores qui caractérisent une culture de *Phycomyces* bien nourrie. Ils apparaissent avec 12 mm de hauteur du milieu.

Dans toutes nos cultures, nous utilisons une quantité de milieu telle que la hauteur ne dépasse pas 10 à 11 mm.

Expérience 16. Essai d'adsorption du facteur actif. Une solution de vitamine B 1 à 20 γ par ccm est bouillie pendant un quart d'heure avec du noir animal puriss.; après filtration et après avoir ramené le filtrat au volume primitif, nous ajoutons ce dernier aux cultures inactives. Il ne se produit aucun développement; la vitamine B 1 est donc adsorbée par le noir animal[1]. Il est intéressant d'observer qu'en traitant les extraits de levures et de germe de blé avec lesquels nous avons primitivement travaillé, nous trouvions aussi que le traitement au noir animal enlevait toute trace d'activité aux extraits riches en facteur de croissance. Peut-être ce facteur n'était-il pas autre chose que la vitamine B 1?

La vitamine B 1 se trouvant également dans l'organisme animal, nous nous sommes demandé s'il était possible de l'adsorber par une méthode biologique, par les globules rouges.

Globules de vache, lavés. 10 ccm de solution de vitamine B 1 à 5 γ par ccm (solution dans NaCl 8 %) sont mélangés avec 3 ccm de suspension dense de globules rouges. Après centrifugation nous récupérons la solution absolument claire de vitamine. Un témoin est constitué par une solution de NaCl à 8 % seul; un second témoin est constitué par une solution de NaCl traitée avec la même quantité de globules rouges.

Vitamine B 1 traitée avec globules: bon dévelop.	106 et 95 mg
Vitamine B 1 non traitée: développement habituel. . . .	92 ,, 95 ,,
Vitamine B 1 non traitée en solution dans NaCl	normal
Chlorure de sodium seul: pas de développement.	
Chlorure de sodium traité par globules: bon développement	51 mg
Sérum normal seul: développement submergé intense . .	20 ,,

Il ressort de cet essai que: 1. Le chlorure de sodium n'exerce aucune action, négative ou positive; 2. La vitamine B 1 ne semble pas adsorbée par les globules de vache; 3. Les globules semblent laisser diffuser dans le chlorure de sodium une substance accélérant le développement et dont l'action se manifeste lorsque le chlorure seul est utilisé, sans

[1] Produit de *Merck*; il faut tenir compte qu'il acidifie fortement la solution avec laquelle il est en contact.

vitamine B 1; 4. Le sérum seul, stérile, exerce une action telle qu'il semble contenir un facteur de croissance.

Expérience 17. Influence de la chaleur sur le degré d'activité de la vitamine B 1. La vitamine B 1 est réputée la moins thermostable des B. Elle n'est cependant pas détruite par un chauffage prolongé. La chaleur sèche agit différemment de la chaleur humide; cette dernière est beaucoup plus inoffensive; le jus de tomate chauffé pendant 4 heures à 130⁰ ne perd que le 55 % de son activité vitaminique B 1. Il n'y a donc pas à s'étonner que la stérilisation à 120⁰ n'altère pas notre produit.

Un chauffage de 6 heures à 130⁰ ne diminue pas son activité.

Tableau XIX.

	4	10	20	40 γ de B 1 pour 40 ccm de milieu
témoin sans vitamine . .	0	0	0	0
chauffé	158	165	160	148 mg
non chauffé	169	144	144	164 „

Partout mycélium aérien bien développé.

Expérience 18. Influence de la cuisson en milieu alcalin. 10 ccm de solution à 20 γ de vitamine B 1 par ccm sont traités pendant ½ heure à 120⁰ avec 2 ccm de NaOH n/10. Neutralisation avec H_2SO_4.

Tableau XX.

	2	6	10	20 γ de B 1 pour 30 ccm de milieu
traité	11	20	24	63 mg
non traité	129	108	146	106 „
traité	28	35	33	43 „
non traité	145	141	140	139 „

Dans les expériences avec traitement alcalin, il se développe un fort mycélium submergé, mais il n'apparaît pas de hyphes aériennes. En considérant le poids de matière produite, on voit que ce traitement en milieu alcalin détruit jusqu'à 80 % de l'activité du facteur de croissance. Un témoin constitué par un mélange acide-base semblable à celui utilisé précédemment, montre que ce mélange n'a aucune action.

Expérience 19. Influence du mode de préparation du milieu et de l'eau utilisée. Le chauffage à 120⁰ produit des modifications profondes dans le milieu. Pour les éviter nous avons stérilisé à part les 4 constituants du milieu; ils sont mélangés refroidis et la vitamine B 1 est ajoutée à la fin. On ne peut faire intervenir aucune combinaison spéciale dans le milieu sous l'influence de la chaleur.

Témoin sans vitamine: pas de développement avec 10 γ de B 1 pour 40 ccm de milieu: développement ordinaire, 110 mg.

On ne peut donc faire intervenir le mode de préparation pour expliquer l'inactivité du milieu normal. De même, le mode de préparation ne semble pas influer sur le mode d'action de la vitamine B 1. Des milieux préparés avec une stérilisation à l'ultra-filtre (à froid) fournissent les mêmes résultats. On ne peut invoquer une combinaison de la vitamine B avec l'un des constituants. Il est souvent fait allusion au rôle que peut jouer la nature de l'eau sur la valeur d'un milieu; dans certains cas l'eau distillée ordinaire peut empêcher complètement le développement d'un microorganisme.

Nous préparons les milieux avec de l'eau courante, très calcaire, de l'eau distillée ordinaire (dans appareil de cuivre) et de l'eau distillée dans un appareil de verre Pyrex, donc sans contact avec du métal. Une partie des milieux est chauffée à 120°; le milieu reste clair. Une autre partie est stérilisée à 135°; il y a une décomposition du sucre, le milieu devient jaune brun.

Tableau XXI.

	°C	sans vit.		avec 10 γ de B 1 pour 30 ccm de milieu	
eau dist. verre	120°	0	0	92	87 mg
„ „ „	135	0	0	84	74 „
„ „ ordin. . . .	120	0	0	89	96 „
„ „ „	135	0	0	88	84 „
„ courante	120	0	0	93	101 „
„ „	135	0	0	88	90 „

La nature de l'eau ne joue donc pas de rôle (dans les conditions de nos expériences). De même le chauffage à 135° ne modifie pas le milieu au point qu'il acquière des propriétés spéciales, permettant un développement de *Phycomyces* sans facteur de croissance.

Nielsen montre que dans un milieu constitué par du glucose (1 %), du tartrate d'ammonium (1 %), du sulfate de magnésie (0,5 %) et du phosphate acide de potassium (1 %), un chauffage à 135° avec une petite quantité de papier filtre dans le milieu liquide, produit un facteur de croissance; le papier filtre semble agir par la matière minérale qu'il contient; l'expérience est faite avec *Aspergillus*.

Nous l'avons répétée avec *Phycomyces*, la température de stérilisation étant de 136°.

Tableau XXII.

sans vitamine		avec 10 γ de B 1 pour 25 ccm de milieu	
0	0	118	123 mg

La vitamine B 1 active donc aussi ce milieu, sur lequel le développement est excellent; la croûte mycélienne de surface est extrêmement dense et les hyphes aériennes bien développées. Le chauffage dans ces conditions, et en présence de papier filtre, ne produit aucune modifi-

cation telle que le milieu, sans facteur de croissance ajouté, puisse agir favorablement sur la croissance du champignon.

Le milieu de *Raulin* avec saccharose pur est tout aussi défavorable que les autres milieux (*Raulin* acide ou neutre). Par contre avec du sucre candi (contenant un facteur de croissance) le développement est excellent. L'adjonction de vitamine B 1 active le milieu à base de saccharose. L'adjonction d'urée seule au *Raulin* acide et neutre produit une légère amélioration; l'adjonction d'urée au *Raulin* avec sucre candi ne produit pas de modifications appréciables.

Expérience 20. Action de la vitamine B 1 combinée a celle d'un ion métallique.

Un grand nombre de métaux sont connus pour leur action catalytique et accélérante sur le développement de microorganismes. Il s'agit généralement de culture sur milieux naturels. Le plus fréquemment cité est le zinc dont l'action est connue depuis *Raulin*. Le mode d'action de ces ions est encore mal connu. Pour le zinc p. ex. il semble que son action soit liée à certaines conditions et ne soit pas aussi générale qu'on l'admet.

D'après certains travaux récents, il semble qu'il faudrait envisager non pas une action directe du ion, mais une action de co-facteur de croissance (action sur un facteur de croissance primaire). Le problème a déjà été examiné dans une publication précédente, particulièrement en ce qui concerne l'action possible d'une substance minérale agissant à l'état de traces et contenue dans l'eau distillée ou provenant d'une autre source.

Il résulte de nos expériences que le zinc ajouté au milieu de *Coons* inactif ne confère à celui-ci aucune activité spéciale, et qu'ajouté au milieu contenant la vitamine B 1, il ne modifie pas l'action de cette dernière:

Coons seul	0
Coons avec zinc	0
Coons avec B 1	139,5 mg (moyenne de 4 expériences)
Coons avec B 1 et zinc	127 „ (idem)

Le même phénomène s'observe lorsqu'on part d'un milieu naturel (à base de malt):

malt 1 % seul	31,25 mg (Moyenne de 4 expériences)
malt 1 % et zinc	29 „ (idem)
malt 1 % et B 1	29,9 „ (idem)
malt 1 % et B 1 + zinc	27 „ (idem)

L'adjonction de vitamine B 1 à un milieu déjà riche en facteur de croissance n'exerce aucune action.

Il est possible que sur un autre milieu naturel, un métal exerce une action catalytique; mais il s'agirait là d'une influence *sur la croissance en cours, fait banal et bien connu, et non pas d'un déclanchement de la*

croissance, ce qui est le cas pour nos expériences et la distingue des essais exécutés avec d'autres organismes.

Des essais ont été pratiqués avec divers ions métalliques (*Schopfer*, 1934). Il en résulte que dans les phénomènes observés au cours d'un très grand nombre d'expériences aucune action primaire d'un ion minéral n'est à envisager.

Sartory (13) a signalé en 1923 que le thorium combiné avec une agitation de la culture, exerce sur *Phycomyces* une action nette. A la concentration de $^1/_{200}$ il a une action antiseptique; l'influence est favorable de $^1/_{5000}$ à $^1/_{10000}$. Le milieu employé est celui de *Raulin*, probablement avec sucre candi. Nous avons appliqué ces données au milieu de *Coons* avec et sans vitamine B 1. Le sel employé est le chlorure de thorium.

Tableau XXIII.

sel de thorium en mg pour 30 ccm de milieu	0	2	4	8	16	20	24
thorium seul	2	2	4	5	9	9	9 mg
vitamine B1 + thorium	137	102	103	130	150	133	107 „

Les milieux avec vitamine B 1 seule donnent des récoltes qui vont de 100 à 140 mg.

Le thorium seul exerce indiscutablement une légère action favorisante; avec 20 et 24 mg pour 30 ccm de milieu il se forme un mycélium submergé bien développé; par contre l'adjonction de ce métal à un milieu contenant déjà la vitamine B 1 ne modifie pas sensiblement l'action de cette dernière. Les chiffres obtenus s'intercalent dans les limites de ceux que donnent les cultures avec vitamine seule. Dans les conditions de nos expériences le thorium ne joue pas le rôle d'un cofacteur de croissance.

Expérience 21. Action de l'agar. Les phénomènes observés dans les milieux liquides se retrouvent aussi nets dans un milieu solide, agarisé. On peut se demander si cette substance, qui est très impure, peut à elle seule jouer un rôle.

Agar (pour 30 ccm de milieu de *Coons*): 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 g. Sans vitamine B 1, il se produit un faible mycélium de surface, mais aucun sporangiophore aérien, malgré une durée de culture de plus de deux semaines.

Avec vitamine B 1 (20 γ pour 30 ccm de milieu), un très fort mycélium aérien apparaît; malgré les variations de consistance des divers milieux, il n'y a pas de grandes différences entre les diverses cultures.

L'agar employé ne semble donc pas contenir de facteur de croissance, ou, tout au moins, s'il en contient un, il ne se manifeste pas dans les conditions de cultures réalisées dans nos expériences. Il n'apporte aucun trouble et peut n'être pas pris en considération dans l'interprétation des résultats. Ce fait a son importance lorsqu'il s'agit de cultures concernant la formation des zygotes.

Expérience 22. Durée d'action de la vitamine B 1. En ce qui concerne le mécanisme de l'action de la vitamine B 1, nous ne savons rien. Cependant, nous observons que même dans les milieux très insuffisants, les germinations de spores se font assez régulièrement. La déficience du milieu n'apparaît qu'ensuite: le flocon formé par l'imbrication des boyaux de germination ne se développe pas. Nous nous sommes demandé combien de temps le mycélium doit séjourner dans le milieu contenant la vitamine pour pouvoir se développer complètement. Est-il nécessaire qu'il y reste définitivement, ou suffit-il qu'il soit pendant les premiers jours de son développement en contact avec le facteur de croissance ?

Un certain nombre de milieux contenant 20 γ de vitamine B 1 pour 30 ccm de liquide sont inoculés d'un manière égale. Après 4 jours de culture, il n'apparaît qu'un faible mycélium submergé; au 6ème jour, la croûte superficielle est formée et les sporangiophores aériens sont prêts à croître.

Les deux mycéliums du 4ème et du 6ème jour sont retirés de leur milieu avec un fil de platine stérile, placés dans de l'eau distillée stérile afin d'être lavés (celà plusieurs fois), puis transportés dans un milieu inactif, sans vitamine B 1. Malgré les troubles apportés par le transfert (plissement et retournement du mycélium), ils se développent bien dans leur nouveau milieu; la croûte superficielle se forme à nouveau, le pigment jaune apparaît en grande quantité, de même que les sporangiophores aériens.

12 cultures avec vitamine B 1 donnent comme récolte sèche: 108, 148, 135, 128, 153, 182, 176, 141, 141, 151 mg.

Le mycélium transporté au 4ème jour fournit dans son nouveau milieu 73 mg de matière sèche, celui du 6ème jour 150 mg.

Il ne semble donc pas que la présence continue de facteur de croissance soit nécessaire; après 4 jours de contact et sans que le flocon produit dépasse 15 mg, le développement est presque normal dans le milieu inactif. Après 6 jours, on ne voit aucune différence avec les cultures qui se sont developpées complètement dans un milieu actif.

On peut admettre qu'il y ait eu accumulation de vitamine B 1 dans le mycélium formé ou que le court contact avec le facteur de croissance a suffi pour développer dans le mycélium, les substances de croissance spécifiques dont le champignon doit avoir besoin. On peut également supposer une adsorption du facteur actif à la surface des hyphes, qu'un simple lavage n'aurait pas pu détacher.

Expérience 23. Action du milieu dans lequel se sont développés les champignons.

6 cultures avec 10 γ de vitamine B 1 pour 25 ccm de liquide sont inoculées d'une manière égale. Après le 2ème, 3ème, 4ème, 5ème et 6ème

jour les mycéliums déjà formés sont retirés, par centrifugation. Le liquide clair est stérilisé à nouveau et utilisé pour de nouvelles cultures, dans des conditions identiques aux précédentes.

Tableau XXIV.

milieu	0 (témoin)	2	3	4	5	6ème jour
poids sec mg . . .	152	95	90	85	37	6

On peut donc affirmer: ou bien la vitamine B 1 disparaît complètement, ou bien il se développe des substances spécifiques ou banales qui résistent à la stérilisation et qui inhibent le développement[1]. Si l'on pense qu'une culture du 6ème jour est encore loin d'atteindre à son complet développement, on penchera pour la première hypothèse. Il est vrai qu'il pourrait s'agir de substances qui inhibent la germination seule et non pas le développement ultérieur; elles empêcheraient seulement les spores nouvellement inoculées de germer. De toute façon, après le 6ème jour le milieu contient encore plus des deux tiers de la quantité initiale de glucose ainsi que de l'azote. Il est donc quantitativement suffisant.

Expérience 24. Richesse des extraits de champignon en facteur de croissance.

Les mycéliums développés (plus de 5 grammes secs) sur deux litres de milieu de *Coons* avec vitamine B 1 sont broyés complètement avec de l'eau et un peu de sable. L'extrait obtenu (40 ccm) est ajouté à un milieu de culture inactif.

Tableau XXV.

quantité d'extrait	1/10	3/10	5/10	1	2	4	8 ccm
stérilisé	68	90	102	99	98	94	47 mg
non stérilisé . . .	50	84	94	93	95	100	98 „

Dans les deux cas le mycélium aérien est très développé. Le facteur formé sous l'influence de la vitamine B 1 ou la vitamine B 1 emmagasinée suffit donc à assurer le développement de nouvelles cultures.

Si l'on ne craignait pas de donner pas une explication par trop simpliste on pourrait dire que la vitamine B 1 disparaît du milieu (expérience 23) et qu'elle se retrouve en partie dans le mycélium formé.

Les milieux de cultures initiaux de cette expérience ne donnent lieu à aucun développement lorsqu'ils sont de nouveau ensemencés; lorsqu'ils sont stérilisés il semble se faire un très faible développement.

[1] Nous avons montré qu'un milieu de culture solide, sur lequel a poussé *Phycomyces*, inhibe la germination de spores fraîches. Si, par contre, ce milieu est chauffé à 120°, les nouvelles germinations sont possibles [*Schopfer* (17)].

Expérience 25. Essai de remplacement de la vitamine B 1 par d'autres substances connues. Il est d'usage courant, lorsqu'on a à faire à un facteur de croissance non identifié, d'essayer de le remplacer par d'autres substances connues. Ce mode de faire n'a plus ici le même intérêt, puisque le facteur en question est cristallisé et chimiquement connu. Diverses amines n'exercent aucune action [*Schopfer* (16)].

Nous avons substitué la vitamine B 1 et le facteur de croissance du germe de blé et de la levure par des traces d'acides aminés suivants: l-leucine, d-leucine, d-alanine, d-l-alanine, d-l-valine, l-dioxyphenylalanine, l-tyrosine, d-l-sérine, l-cystine, acide glutamique, arginine, d-lysine, l-histidine, d-l-proline, l-proline, l-oxyproline, tryptophane, ornithine. Aucun de ces acides n'exerce d'action pas plus que la cystéine, le glutathion, le bleu de méthylène, l'acide ascorbique, l'acide adénylique. Le carotène pur, en solution colloïdale, est sans influence. Des substances banales comme l'acide urique, les urates, l'urée ne jouent naturellement aucun rôle.

Quoique des essais de ce genre n'aient plus grande signification, nous les continuons avec diverses substances qui, dans certains phénomènes biologiques, peuvent jouer un rôle de catalyseur, ainsi qu'avec les corps qui, dans l'expérimentation avec les animaux, sont censés pouvoir se substituer en partie à des vitamines proprement dites. En résumé, pas plus que nous n'avons une condition de culture telle que *Phycomyces* puisse se développer sans facteur de croissance, nous ne pouvons indiquer une substance capable de remplacer la vitamine B 1 dans son action si singulière.

Le mannitol qui pour *Streptothrix corallinus* intervient dans la croissance (*Reader*) et l'inositol qui jouerait également un rôle dans l'effet „bios" (*Eastcott*) sont sans action sur *Phycomyces* lorsqu'ils sont employés seuls, au titre de facteur de croissance.

D. Calcul des doses minima et des rapports.

La quantité de substance minimale encore active est extrèmement faible. D'après les essais de l'expérience 6 (doses variables de B 1), il suffit de 0,02 γ pour 40 ccm de milieu pour rendre celui-ci assimilable, soit 0,0005 γ par ccm de milieu. Avec 0,0025 γ par ccm, le développement devient normal. Cette première quantité, 5 dix-milliardièmes, est certainement l'une des plus faibles que l'on ait observées dans ce domaine.

V. Reader (10) dans son étude sur le facteur de croissance de *Streptothrix corallinus* indique qu'une quantité de substance de $5 \cdot 10^{-7}$ g pour 100 ccm suffit à provoquer un bon développement de cet organisme.

Nos quantités sont encore plus faibles. Elles sont du même ordre de grandeur que celle des infiniments petits chimiques (de nature minérale): d'après *Bertrand* le manganèse agit à la dose de $1 \cdot 10^{-10}$ sur *Aspergillus*; encore s'agit-il là de la formation des conidies et non pas du développement total.

Il est intéressant d'observer qu'à partir de 1 γ pour 40 ccm, la vitamine B ajoutée n'agit plus proportionnellement à sa quantité; un excès est totalement privé d'influence; souvent même nous observons une légère diminution dans la quantité de matière produite.

Le calcul du rapport entre la dose de vitamine B 1 et le poids du mycélium produit est également suggestif. D'après l'expérience 6, le rapport croît de 0,02 à 0,1 γ (pour 40 ccm de milieu); il passe de 400000 à 500000, puis décroît avec des quantités croissantes de vitamine B 1. Il faut également observer que la dose de vitamine correspondant à un maximum du rapport $\frac{\text{poids sec produit}}{\text{quantité de vitamine}}$ ne correspond pas exactement, il s'en faut de beaucoup, avec la dose qui marque un arrêt dans l'augmentation de poids du mycélium produit.

Il faudra, dans la suite, examiner l'influence de la vitamine B 1 sur le coefficient économique et déterminer, pour un poids de mycélium donné, si la consommation en sucre est modifiée. Cette étude sera faite dans un prochain travail

E. Mécanisme de l'action de la vitamine B 1.

Cette question, qui est capitale pour la compréhension de l'action des vitamines et des facteurs de croissance est encore entourée de beaucoup d'obscurité. Il ne peut être émis à ce sujet que des hypothèses. Le premier point à examiner est celui-ci: l'action observée est-elle réellement due à la vitamine ou à une impureté qui lui serait jointe ? La préparation de vitamine que nous avons (B 1), obtenue après plusieurs cristallisations présente toutes les garanties de pureté. La dose à laquelle elle commence à agir (5 dix milliardièmes) est si faible que nous avons de la peine à rapporter cette action à un autre corps qui lui serait présent à une dose inconcevablement petite. Si l'on veut faire intervenir une impureté de nature minérale, il faut se rappeler que l'action la plus faible qui ait été observée jusqu'à maintenant (action positive) est celle du manganèse qui agit à la dose de 10^{-10}; celle-ci est du même ordre de grandeur que les doses observées par nous en ce qui concerne la vitamine B 1. Si l'on veut admettre une impureté agissant à la manière du manganèse, on voit aisément à quelle dose on arrive.

Cependant, dans le domaine des infiniments petits chimiques, une fois admise la possibilité d'une action à l'état de trace, il faut, pour être conséquent avec soi-même, pousser le raisonnement théorique jusqu'à ses limites extrêmes; si quelques molécules seules sont encore présentes, on doit encore envisager une action possible. Mais ce problème échappe à l'expérimentation directe.

Il est nécessaire de s'arrêter une fois sur cette voie. Le raisonnement est admissible tant que l'on n'a pas une substance cristallisée, pure

et tant que la dose de substance à ajouter est encore assez considérable. Mais si, comme c'est cas pour nos recherches, on arrive à un produit incontestablement pur agissant à l'état de traces infimes, on peut logiquement conférer à cette substance l'action qui s'exprime dans nos expériences.

Nous admettons donc que c'est la vitamine B 1 qui agit.

Il semble aventureux de faire intervenir chez un microorganisme une vitamine specifiquement animale. La jonction n'a pas jusqu'à maintenant été établie. Cependant, si nous pensons que la plupart des vitamines indispensables aux animaux sont fournies par les plantes, il faut admettre que ces substances doivent jouer un rôle chez les végétaux. Comment le facteur de croissance agit-il? Nous pouvons dire: la vitamine B 1 favorise, dans des conditions données, l'assimilation des sucres; pour un quantité donnée de sucre et de vitamine, l'action est d'autant plus forte que la teneur en asparagine est plus élevée. Mais il s'agit là d'une constatation plus que d'une explication.

Nous nous demandons d'abord si la vitamine agit indirectement ou directement?

L'examen de la figure 10 avec la courbe ascendante du rapport $\frac{\text{poids sec produit}}{\text{quantité de vitamine}}$ pourrait s'expliquer en faisant intervenir une substance inconnue, présente dans le milieu, provenant de l'eau ou des constituants du milieu et qui à l'état de traces infimes, paralyserait le développement des spores qui viennent de germer.

Cette hypothèse — difficile à démontrer — ne peut pas être rejetée à priori; la quantité de vitamine B 1 qui agit (limite inférieure d'action) est du même ordre de grandeur que les impuretés métalliques imprévisibles et non décelables — même à l'aide des méthodes à la touche — qui peuvent provenir de l'eau ou de l'un des constituants du milieu. Elle est infiniment plus petite que la quantité d'eau lourde qui doit théoriquement se trouver dans l'eau ordinaire du milieu (si la stérilisation n'en modifie pas la teneur).

La vitamine agirait en neutralisant cette substance et permettraît par là le développement normal du champignon. On sait la peine que l'on a à obtenir un milieu qui soit totalement dépourvu d'impuretés métalliques, zinc p. ex. Ces impuretés métalliques peuvent être jointes aux réactifs les plus purs, pour analyse et avec certificat de garantie. Cependant si l'on admet cette action inhibitrice d'une impureté non définie il est curieux de remarquer que *seule la vitamine B, à l'exclusion d'un grand nombre de substances essayées, posséderait la propriété de neutraliser son action dans le milieu.*

Si l'on veut faire intervenir une impureté inhibitrice initiale de l'eau distillée ou de toute autre origine, il faut essayer de préparer des milieux dont ces impuretés soient absentes. Nous avons tenté de purifier

l'eau distillée par un traitement au noir animal actif. Ce traitement repose sur le principe suivant: en milieu faiblement alcalin, les traces de sels métalliques passent à l'état de combinaisons insolubles tels que phosphates, hydroxydes etc., qui peuvent être adsorbées par le charbon. Si tel est vraiment le cas et si ces substances jouent réellement un rôle, sur un milieu préparé de la sorte et dépourvu de facteur de croissance, le champignon devrait se développer normalement. Celà n'a pas été observé jusqu'à maintenant. Les résultats de ces expériences qui sont continuées, seront communiquées dans un prochain travail.

Pour l'instant, nous pouvons admettre comme hypothèse de travail, que la vitamine B 1 agit directement sur le métabolisme du champignon. Les faits observés sont valables pour *Phycomyces* seul; les autres *Mucorinées* ne réagissent pas avec la même intensité, tout au moins au facteur contenu dans le germe de blé. Il doit manquer quelque chose à *Phycomyces* pour accomplir son développement; grâce à l'intervention de la vitamine B 1 dans le métabolisme de ce champignon et dans les réactions enzymatiques qui sont à sa base, le développement peut se produire. Grâce à ce ou à ces facteurs, *Phycomyces* peut accomplir complètement sa croissance en milieu submergé — en anaérobiose relative — et passer à la vie aérobie normale; les tropismes qui permettent aux sporangiophores de s'élever à la surface du milieu se manifestent.

Remarquons qu'à partir d'une certaine dose de vitamine (0,8 γ), le poids du champignon n'augmente plus. Mais avec une dose beaucoup plus faible (0,1 γ), le rapport $\frac{\text{poids sec produit}}{\text{quantité de vitamine}}$ cesse d'augmenter et même diminue. Ces observations sont valables pour la dose de sucre utilisée. Ce n'est qu'avec des doses faibles de vitamine que le rendement est bon. Avec des doses de plus en plus fortes, la vitamine n'est plus complètement utilisée pour l'augmentation de la matière vivante produite. (Voir fig. 10, 11, 12.)

Si nous admettons un coefficient d'utilisation de 50 % environ, ce qui est généralement le cas pour *Phycomyces* (de 40 à 50 %), nous voyons que pour former 110 mg de matière vivante sèche, il y a dû avoir une utilisation de 220 mg de glucose; or le milieu en contient environ 3,3 g. La quantité de sucre consommée dépasse de beaucoup 220 mg. Nous ne connaissons rien du rôle de la vitamine B 1 sur cette consommation totale. Nous ne savons pas le rôle qu'elle peut exercer sur la respiration. Cette étude de l'action de la vitamine B 1 sur le coefficient d'utilisation et sur le métabolisme énergétique doit être entreprise.

Jusqu'à maintenant, chaque fois que l'on a à faire à un facteur de croissance de microorganisme, on invoque plus ou moins clairement la

notion de bios. Le bios était primitivement la substance nécessaire à la croissance de certaines levures; cette théorie, reposant sur des faits expérimentaux certains, est issue des discussions de *Liebig* et de *Pasteur* et des travaux de *Wildiers*. Cette substance, qui en fait est le premier facteur de croissance signalé, n'à jamais été isolée. Les produits que l'on a cru

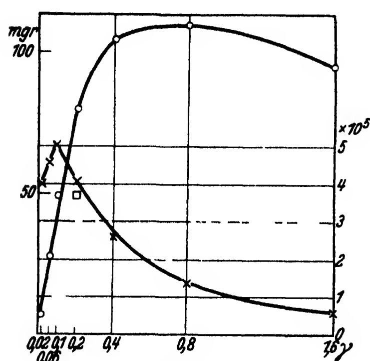


Fig. 10.

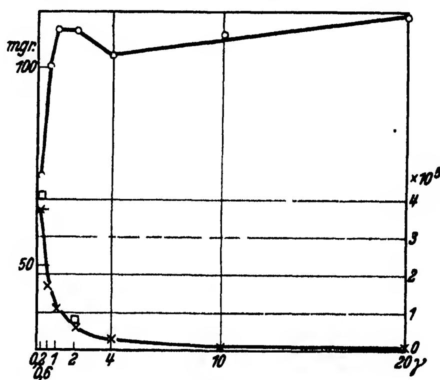


Fig. 11.

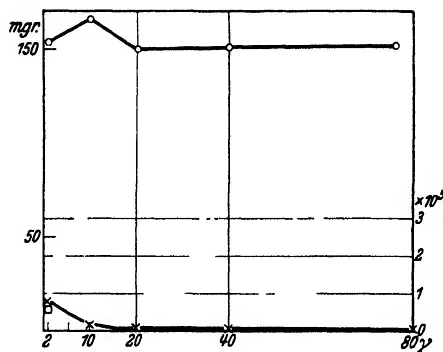


Fig. 12.

Fig. 10, 11, 12. Poids sec du champignon et valeur du rapport $\frac{\text{poids sec}}{\text{vitamine}}$, en fonction de doses variables de vitamine B 1.
□: raccord des courbes entre elles.

obtenir ont une activité discutable et ont fait l'objet de nombreuses controverses. Ce bios serait apparenté aux vitamines B proprement dites et s'en distinguerait par une plus grande thermostabilité et une plus grande résistance aux alcalis.

C'est au bios que *Wassink* (27) croit pouvoir rapporter les phénomènes que nous avons signalés chez *Phycomyces*. Nous avons déjà montré que la technique utilisée par cet auteur [*Narayanan* et *Drummond* (7, 8)], pour séparer le bios de la vitamine B 2, et que nous avons

appliquée [*Schopfer* (24)] pour préparer le facteur de croissance à partir du germe de blé, sépare bien la vitamine B 2 du bios. mais ne sépare pas le bios de la vitamine B 1. Dans les extraits que nous avons utilisés jusqu'à maintenant, la vitamine B 1 est certainement présente. Sa thermostabilité n'est tout de même pas si faible qu'elle soit détruite dans nos milieux. On peut donc expliquer tous les phénomènes observés jusqu'à maintenant chez *Phycomyces* par l'action de la vitamine B 1 seule, sans faire intervenir le bios problématique.

III. Action des vitamines cristallisées sur la fermentation alcoolique.

Une culture de *Saccharomyces cerevisiae Hansen* (*de Baarn*) nous donne les résultats suivants (milieu semblable à celui utilisé pour *Phycomyces*): 30 ccm de milieu sont ensemencés avec 4000000 de cellules de levure. Les *Erlenmeyers* reçoivent:

1 ccm d'extrait de germes de blé (à 17 % de résidu sec).
1 „ d'extrait alcoolique de levures.
1 „ d'extrait concentré de levures (*Harris*).
1/2 „ de solution de vitamine B 1 (10 γ).
1/2 „ de solution de vitamine B 2 (10 γ).
Flacon témoin.

Le sucre utilisé (méthode de *Bertrand*), l'alcool formé, le poids de levures produites sont mesurés.

Tableau XXVI.

	sucre utilisé	alcool produit	poids levures
germe de ble	7,05 g	2,8 %	0,120 g
extr. alc. levures	6,3 g	2 %	0,550 g
extrait conc lev.	1,55 g	0,2 %	0,012 g
B1	0,3 g	—	—
B2	0	—	—
témoin	0,2 g	—	—

La teneur en sucre initiale est de 10 %.

Le poids des levures ensemencées ne constitue pas une cause d'erreur. La simple agitation des milieux permet par appréciation néphélométrique d'apprécier les différences. Nous n'avons pas déterminé la croissance relative (rapport entre le nombre de cellules et le nombre de cellules formées, d'après *T. Philipson*, 1930). La détermination du nombre de cellules d'ensemencement se fait avec la chambre à compter de *Zeiss-Thoma*.

On voit donc que — dans les conditions de nos expériences — les vitamines B n'exercent aucune action „bios" sur la fermentation, alors que tous les extraits utilisés précédemment avec *Phycomyces* agissent d'une façon marquée.

L'extrait concentré de levures (*Harris*) est celui qui agit le plus fortement sur *Phycomyces*; il est curieux de relever que c'est lui qui semble le moins actif sur la fermentation de *Saccharomyces cerevisiae* Cette étude sur l'action des vitamines sur la fermentation n'a pas été poussée plus loin. Il nous suffit pour notre démonstration de trouver une souche qui soit très sensible à l'effet „bios" (accélération de la division des cellules) et pas du tout aux vitamines. Nous ne connaissons pas l'action de ces dernières sur la fermentation en cours.

IV. Relations entre la vitamine B 1 et le bios.

Nous ne soulevons pas la question de l'identité du facteur de croissance pour levures et de la vitamine B 1 ou B 2. Cette identité fut d'abord admise au point que l'on pensait pouvoir mesurer la valeur d'un produit en vitamine B (antinévritique) par l'action de ce dernier sur la fermentation alcoolique. La non-identité des deux facteurs fut ensuite démontrée, et l'on a admis, d'une façon peut-être hâtive, que seul un facteur de croissance de microorganisme pouvait agir sur la levure. Nous démontrons dans ce travail que l'on peut tout expliquer chez *Phycomyces* en faisant intervenir la vitamine B 1 seule à l'exclusion du bios.

Cependant une autre hypothèse serait possible — pour l'instant simple jeu de l'esprit — qui permettrait de faire rentrer dans nos conceptions le bios ou tout autre facteur de croissance de microorganisme spécifique. La vitamine B 1 ne pourrait-elle pas permettre et favoriser la production de ce facteur spécifique? On classe grossièrement les microorganismes en trois groupes, du point de vue de leurs besoins en facteur de croissance: ceux pour qui un facteur venant de l'extérieur est indispensable; ceux qui peuvent se développer sans ce dernier, mais qui prospèrent mal et ceux pour qui un tel facteur n'est pas nécessaire. Il a été démontré que certains champignons ont la propriété de laisser diffuser dans leur milieu le facteur qui leur manque; la croissance peut alors s'accomplir normalement sans adjonction de facteur extérieur. On pourrait admettre que toutes les *Mucorinées* étudiées, qui sont moins sensibles au facteur de croissance et se développent sans lui, posséderaient justement la possiblité de fabriquer et de diffuser le facteur indispensable.

Phycomyces seul ferait exception; il lui faut une facteur venant de l'extérieur ou la possibilité de le fabriquer: cette possibilité lui serait fournie par la vitamine B 1. Ce processus: vitamine B 1 → bios, serait l'inverse de celui que l'on admet et qui semble prouvé à l'heure actuelle: bios → vitamine B 1. Le bios indispensable à la croissance de la levure permettrait à celle-ci de synthétiser le facteur antinévritique. Ce pouvoir de synthèse est spécifique; toutes les

levures et les champignons ne le possèdent pas. *Monilia candida, Torula rosea, Mycoderma cerevisiae* fabriquent le bios, *Monilia candida* fabrique du facteur B. La possiblité d'un tel passage: bios → vitamine B, et l'hypothèse d'un passage: vitamine → bios, est rendue plausible par les grandes analogies qui existent entre le facteur antinévritique et le facteur de croissance pour levure (bios); cette analogie repose sur l'identité du matériel de départ et sur l'identité de certaines propriétés. Cependant notre hypothèse n'est pas démontrable par le fait que si l'étude de la vitamine B fait de grands progrès, celle du bios laisse encore beaucoup à désirer. Pour les rapports entre le bios et les vitamines B voir l'exposé de *Randoin* et *Simonnet* in „Les Vitamines 1927" (12).

Par contre nous ne savons pas si, dans nos extraits précédemment utilisés, levures, germe de blé, pollen c'est bien la vitamine B 1 seule qui agit à l'exclusion de tout autre facteur de croissance pour microorganisme et si c'est elle qui recouvre l'action de ce que nous avons appelé le facteur M.

Il n'est pas impossible qu'il y ait deux actions, qu'il s'agirait de séparer dans les extraits impurs que nous avons préparés. Les extraits cités se sont montrés beaucoup plus stables aux alcalis que la vitamine B 1.

Si nous pouvions démontrer que *Phycomyces*, cultivé sur milieu contenant la vitamine B 1 seule, est capable de fabriquer le facteur de microorganisme qui lui manque, et par là démontrer que ce champignon réagit comme tant d'autres microorganismes à un facteur différent de la vitamine B 1, nous pourrions admettre que dans les extraits cités c'est à la fois la vitamine B 1 et le facteur de croissance de microorganisme qui s'y trouve certainement (voir action sur la levure) qui agissent. Pour l'instant, nous faisons intervenir la vitamine B 1 seule.

On pourrait être tenté de généraliser les résultats obtenus et de voir dans la substance qui agit sur *Phycomyces* un facteur de croissance particulier qui agirait en favorisant la croissance et le développement cellulaire. Il serait prématuré de faire une telle généralisation, par le fait qu'il n'est pas encore possible de retrouver avec les autres *Mucorinées* les faits si singuliers qui caractérisent *Phycomyces*.

De toute façon c'est la première fois que l'on peut montrer avec certitude l'action d'une vitamine cristallisée B 1 sur un microorganisme.

V. Conclusions.

1. L'impossibilité de cultiver *Phycomyces blakesleeanus* sur un milieu synthétique est confirmée, à l'aide de diverses souches de sexe (+) et ( ).

2. En faisant varier les divers constituants du milieu utilisé il n'est pas possible de réaliser des conditions telles que le champignon se développe normalement.

3. L'adjonction d'une très petite quantité de vitamine B 1 au milieu inactif suffit à permettre un développement très intense du champignon. Il peut alors se développer sur un grand nombre de substances carbonées ou azotées.

4. Parmi les hydrates de carbone courants, le lactose seul n'est pas assimilé.

5. Grâce à cette adjonction de vitamine, il est possible de déterminer les besoins du champignon et de fixer les doses optima de sucre et d'azote (asparagine).

6. La dose d'azote joue également un rôle important: en présence d'une quantité suffisante de vitamine B 1, une augmentation de la ration azotée produit une très forte élévation de la quantité de la matière vivante produite.

7. Le maximum d'activité de la vitamine B 1 semble se trouver aux environs de la neutralité (p_H 7—7,2).

8. Les phénomènes observés avec adjonction de B 1 se retrouvent malgré un chauffage à 135°.

9. Ils sont fortement atténués par un traitement alcalin à l'autoclave.

10. Le mode d'action de la vitamine B 1 est examiné: une action indirecte par neutralisation d'une substance inhibant le développement dans les milieux utilisés est partiellement possible, mais non démontrée. Il semble plutôt s'agir d'une action directe sur l'assimilabilité des aliments banaux du milieu.

11. Une action relevant d'une impureté jointe à la vitamine B 1 cristallisée ne semble pas admissible.

12. La possibilité d'une transformation par *Phycomyces*, de la vitamine B 1 en un facteur de croissance de microorganisme est envisagée.

13. Les vitamines B 1 et B 2 sont sans action sur la fermentation alcoolique de *Saccharomyces cerevisiae*. L'effet bios est bien distinct de l'effet vitamine B 1.

14. Il n'est pas certain que dans les extraits précédemment utilisés (germe de blé, levure, pollen) la vitamine B 1 soit seule active.

15. L'explication des phénomènes observés peut se faire entièrement sans faire intervenir une action de bios externe (dépendant d'une substance ajoutée au milieu).

Ces résultats sont liés à la pureté des produits cristallisés utilisés.

La formule suivante représente réellement le milieu rigoureusement synthétique nécessaire à *Phycomyces*: glucose 10 %; asparagine 2 ‰; sulfate de magnésie puriss. 0,5 ‰; phosphate acide de potasse puriss. 1,5 ‰; vitamine B 1 crist. 25 γ-%.

Note finale. Au cours de la correction nous avons effectué des essais complémentaires avec un échantillon de lactoflavine préparé par Monsieur *Karrer* (Zürich). Les résultats furent presque complètement négatifs. La préparation de *Karrer* nous a été envoyée à l'état cristallisée; celle de *Kuhn* nous est parvenue en solution; il se pourrait donc que cette dernière contienne un autre facteur actif, à l'état d'impureté. De toute façon l'action spécifique de cette vitamine sur *Phycomyces* est remise en question. Un produit synthétique dû également à l'obligeance de Monsieur *Karrer* que je remercie, s'est montré totalement inactif. Il s'agit de la 9-(Dioxypropyl-)isoalloxazine, qui présente des propriétés analogues à celles de la lactoflavine.

VI. Bibliographie.

1) *R. Kuhn*, *P. György* u. *T. Wagner-Jauregg*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **6**, 1034, 1933. — 2) *R. Kuhn*, *H. Rudy* u. *T. Wagner-Jauregg*, ibidem **6**, 1950, 1933. — 3) *P. György*, *R. Kuhn* u. *T. Wagner-Jauregg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **223**, 27, 1933. — 4) *Idem*, ibidem **223**, 21, 1933. — 5) *R. Kuhn* u. *T. Wagner-Jauregg*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **67**, 361, 1934. — 6) *A. Lendner*, Ann. Sc. nat. 8e sér. **3**, 1, 1897. — 7) *B. T. Narayanan*, Biochem. J. **24**, 6, 1930. — 8) *B. T. Narayanan* and *J. C. Drummond*, ibidem **24**, 19, 1930. — 9) *J. Orr-Ewing* and *V. Reader*, ibidem **22**, 440, 1928. — 10) *V. Reader*, ibidem **22**, 434, 1928. — 11) *Idem*, ibidem **23**, 61, 1929. — 12) *L. Randoin* et *H. Simonet*, Les données et les inconnues du problème alimentaire. II. La question des vitamines. Paris 1927 (Rapport entre le bios et les vitamines B). — 13) *A. Sartory* et *R. Sartory*, C. r. Soc. biol. Paris **88**, 743, 1923. — 14) *W. H. Schopfer*, C. r. Soc. phys. hist. nat. Genève **47**, 165, 1930 (action du maltose). — 15) *Idem*, Bull. Soc. bot. suisse **40**, 87, 1931; **41**, 73, 1931 (action des levures et extraits de levure). — 16) *Idem*, ibidem **41**, 335, 1932 (germe de blé). — 17) *Idem*, C. r. Soc. phys. hist. nat. **50**, 152, 1933 (action de Penicillium). — 18) *Idem*, ibidem **51**, 29, 1934 (pollinies d'orchidées). — 19) *Idem*, ibidem **51**, 169, 1934 (pollen). — 20) *Idem*, Ann. Mycolog. **32**, 1934 (action du saccharose). — 21) *Idem*, Bull. Soc. bot. suisse **43**, 141, 1934. — 22) *Idem*, C. r. Soc. phys. hist. nat. Genève **51**, 26, 1934. — 23) *Idem*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **52**, 308, 1934 (vitamine B 1 et B 2). — 24) *Idem*, Arch. f. Mikrobiol. **5**, 502, 1934 (germe de blé). — 25) *H. Simonet*, Zeitschr. f. Vitaminforsch. **2**, 28 u. 94, 1933. — 26) *A. L. Sergent*, Les facteurs de croissance des microbes sur milieux artificiels, Paris Doin 1928 (Etude des divers facteurs de croissance de microorganisme; rapports avec la vitamine B). — 27) *E. C. Wassink*, Rec. d. Trav. bot. néerl. **31**, 583, 1934. — 28) *J. Wesendonck*, Planta **10** 456, 1930. — 29) *R. J. Williams* and *J. M. Honn*, Plant-Physiology **7**, 629, 1932. — 30) *A. Windaus*, *R. Tschesche*, *H. Ruhkopf*, *F. Laqueur*, *F. Schultz*, Nachr. v. d. Ges. d. Wissensch. zu Göttingen, Mathem.-Physik. Kl. 1931, S. 207. — 31) *A. Windaus*, *R. Tschesche*, *H. Ruhkopf*, 2. Mitteilung d. Mathem.-Physik. Kl. 1932, S. 342.

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie der Universität Amsterdam.)

Über die Ursachen des Aufblähens von Belebtschlamm.

Von

Jan Smit.

Mit 12 Textabbildungen.

(Eingegangen am 3. Oktober 1934.)

Historisches.

Während in den ersten 10 bis 15 Jahren nach dem Entstehen der Methode des aktivierten Schlammes die Betriebsführung von Kläranlagen dieser Art zu dem Auftreten einer Blähung oder „bulking" des Schlammes keinen Anlaß gegeben zu haben scheint, mehren sich in den letzten Jahren die Klagen über diese krankhafte Erscheinung in auffallender Weise, und es hat den Anschein, als ob man jetzt offener zu sprechen wagt über ein Übel, das man früher mehr oder weniger zu verheimlichen sich gezwungen fühlte. Jetzt aber kann man kaum noch eine Beschreibung einer Belebtschlammanlage in die Hand nehmen, worin nicht das gelegentliche Vorkommen der Schlammblähung zugegeben wird. Wo es nicht einer unbekannten Ursache zugeschrieben wird, machen die meisten Autoren eine mangelhafte Belüftung dafür verantwortlich, wodurch das Wachstum von *Sphaerotilus* und ähnlichen *Fadenbakterien* (*Cladothrix*) veranlaßt werden soll, die durch ihre ineinandergewundenen Massen die Volumenvergrößerung des Schlammes und damit den Verlust der Absetzbarkeit herbeiführen sollen.

In letzter Zeit ist namentlich in England die Frage nach der Ursache des Blähens öfters erortert worden, und viele hervorragende Fachleute haben ihre Meinung geäußert anläßlich eines Vortrages von *W. Clifford* (1), der der Erscheinung jede biologische Ursache abspricht und nur noch die Menge des Schlammes dafür verantwortlich macht.

Man hat diese Meinung nicht unwidersprochen gelassen und darf wohl *G. J. Fowler* (2) Recht geben, daß hier eine gewisse Begriffsverwirrung vorzuliegen scheint, indem man die erschwerte Absetzbarkeit des Schlammes in einer schlammreichen Mischung (aber ohne jede Herabsetzung der Schlammdichte) mit der typischen Blähung verwechselt, bei der die Schlammdichte (Trockensubstanz je Volumeneinheit) bis auf einen sehr geringen Minimalwert zurückgeht und der hellbraune Schlamm oft fast durchsichtig wird (Abb. 1). In diesen Fällen sind meiner Erfahrung nach *immer* die untereinander verwachsenen Bakterienfäden in großer Zahl anwesend, und die Stärke des Blähens geht der Menge dieser Bakterien parallel. Indessen darf man *Clifford* zugeben (wie auch *Fowler* tut), daß die Unterbelüftung des Schlammes einen gewissen Einfluß auf die kritische Schlammenge ausübt, bei welcher die verzögerte Absetzbarkeit des normalen Schlammes anzufangen pflegt.

Hier wird nur von der Blähung des *abnormen* Schlammes die Rede sein.

Über die Ursachen dieser Erscheinung hat man sich noch nicht einigen können. Während die meisten Autoren eine Unterbelüftung dafür verantwortlich gemacht haben, und z. B. *Kolkwitz* (3) die Erscheinung als eine Störung des Gleichgewichts zwischen absorptiver und regenerativer Kraft des Schlammes erklärte, durch die das Wachstum der Fadenbakterien ausgelöst wird, hat *Scott* (4) wohl als erster den ausschließlichen Einfluß der Belüftung verneint und gezeigt, daß Zucker (Brauereiabwasser) und Stärke die Erscheinung hervorrufen können. Zur selben Zeit haben *Ruchhoft* und *Watkins* (5) aus dem Blähschlamm der Des Plaines River-Anlage die Fadenbakterien gezüchtet.

Dieser Einfluß des Zuckers und der Stärke ist von mir 1932 sichergestellt worden (6), indem ich zeigen konnte, daß 1 g/Liter Zucker und 2 g/Liter Stärke zwar durch den eingearbeiteten Schlamm glatt verzehrt werden, aber genügen, die Blähung hervorzurufen, und daß diese wieder rückgängig gemacht werden kann, wenn man den Schlamm mit zuckerfreiem Abwasser belüftet. Dagegen konnte gezeigt werden, daß die Zuckermenge in normalem (Amsterdamer) Abwasser weit unter der genannten Grenze bleibt, und daß eventuell beigemischter Zucker durch das Abwasser ziemlich schnell zersetzt wird, also kaum die Abwasserkläranlage erreichen dürfte.


Abb. 1. Stark blähender Belebtschlamm.

Neuere Versuche haben dargetan, daß die Zersetzungsprodukte des Zuckers, organische Säuren und Salze, ebenfalls wirkungslos sind. Von Säuren wurden geprüft Milch-, Essig-, Ameisen-, Butter- und außerdem Salzsäure. Der Schlamm hatte die Fähigkeit, große Mengen dieser Säuren (bis zu 200 mg Liter und mehr) abzubauen, wenn nur das Anfangs-p_H nicht unter 5 lag. In diesen Fällen war das p_H in einigen Stunden wieder bis oberhalb 7 gestiegen, und der Schlamm blieb auch bei öfters erneuter Zugabe auf die Dauer gesund. War dagegen der Anfangswert 4 bis 4,5, so blieb er in den meisten Fällen auf dieser Höhe, und der Schlamm war bald durch Schimmelwachstum verdorben. Eine richtige Blähung blieb aber aus, und es zeigte sich nur eine etwas verstärkte Schlammzunahme, besonders nach einem Milchsäurezusatz, während bei Salzsäure eine Schlammzehrung unverkennbar war.

In letzter Zeit hat sich in Deutschland *Fr. Schmiedt* mit dieser Frage befaßt (7); seine Untersuchungen führten ihn zu der Auffassung, daß niedrige Lufttemperatur und der Schwefelwasserstoffgehalt des Abwassers die weitaus wichtigsten Ursachen der Erscheinung sind. Dagegen verneint er auf Grund seiner Versuche die Bildung eines Blähschlammes durch Zuckerzusatz, obwohl nach seinen Angaben die Farbe nach „Semmelgelb“ umschlagen soll. Diese Äußerungen veranlaßten mich zur Nachprüfung des Einflusses einer Sulfidzugabe. Meine Erfahrungen standen aber zu den *Schmiedt*schen in völligem Widerspruch. Während er eine Menge von

0,3 bis 0,5 mg/Liter für schädlich erklärt, fand ich, daß die fortwährende Zugabe einer Na_2S-Lösung, entsprechend 5 mg und sogar 10 mg/Liter H_2S*, vom Schlamme während einer längeren (20tägigen) Periode gut vertragen wurde, und daß eine Schwarzfärbung des Schlammes die einzige sichtbare Reaktion war. Eine Blähung wurde nicht wahrgenommen, obwohl die Klärwirkung etwas nachließ und das Wasser sich trübte.

Ich übergehe die Ergebnisse einer längeren Reihe von Versuchen über den Einfluß der verschiedensten Stickstoffverbindungen, die man im Abwasser nachweisen oder nur vermuten kann, weil sie sämtlich negativ ausfielen.

Aus dem eben Mitgeteilten muß man erkennen, daß es nicht möglich sein wird, einen Stoff oder einige Stoffe zusammen für das Auftreten des Blähens verantwortlich zu machen. In dieser Hinsicht sind die Ergebnisse, welche in einer Versuchsanlage in Amsterdam-West gewonnen wurden, von erheblichem Interesse. Die Anlage ist derart eingerichtet, daß man die Reinigung in zwei Stufen von veränderlicher Zeitdauer vornehmen kann, nach denen je ein Klärbecken zur Trennung des Schlammes vom Wasser angeordnet ist. Jede Stufe hatte ihren eigenen selbst gebildeten Schlamm, welcher nach Bedarf reaktiviert werden konnte, ehe er aufs neue zur Arbeit kam. Das Wasser (100 cbm in 24 Stunden) war der Abfluß einer Emscherbrunnenanlage und wies während der Versuche eine Permanganatzahl von 400 bis 800 mg/Liter auf. Die erste Stufe erniedrigte diese Zahl je nach der Belüftungszeit auf etwa 200 bis 250 mg/Liter, so daß man erwarten konnte, die zweite Stufe würde dieses tüchtig vorgereinigten Wassers ohne Mühe Herr werden. Die Erfahrung lehrte aber, daß die zweite Reinigung unverhältnismäßig lange Zeit erforderte (etwa 16 Stunden Belüftung), und daß außerdem der anfangs sehr schöne braune Schlamm alle paar Wochen einer heftigen Blähung unterlag, obwohl die erste Stufe doch schon Stoffe wie Zucker und Schwefelwasserstoff bis auf den letzten Rest beseitigt hatte und in dem verhältnismäßig dünnen Ablauf der ersten Stufe keine anderen Stoffe nachgewiesen werden konnten, die für diese sonderbare Erscheinung hätten verantwortlich gemacht werden können. Dagegen blieb der graue, stark überlastete Schlamm der ersten Stufe dauernd auf voller Wirksamkeit und blähte nicht, obwohl er die größte Menge der Verunreinigungen, darunter Zucker und H_2S, zu verarbeiten bekam.

Für diese Tatsache kamen zwei Erklärungsmöglichkeiten in Betracht: erstens die, daß das Wasser der ersten Stufe zu konzentriert war oder Stoffe enthielt, die die Organismen der Blähung schädigten, zweitens die, daß das Wasser der zweiten Stufe zu wenig von denjenigen Verbindungen enthielt, die als Bausteine des normalen Schlammes dienen

* Die Darbietung von reinem H_2S hatte keinen Erfolg, da es in kurzer Zeit mit der Luft fortgerissen wurde.

können, so daß nur noch die Fadenbakterien sich vermehren. Die erste Auffassung verlor ihre Wahrscheinlichkeit, als sich herausstellte, daß die aus dem Schlamme gezüchteten Fadenbakterien (worüber später) sich in dem unverdünnten Abwasser ebensogut oder noch besser vermehren können wie in dem halbwegs gereinigten. Die zweite Möglichkeit mußte fallengelassen werden angesichts der Tatsache, daß der Schlamm in der zweiten Stufe einen normalen Zuwachs zeigte und während 2 oder 3 Wochen auf voller Wirksamkeit blieb (sei es, daß die Reinigung mehr Zeit erforderte, als es die ziemlich geringe Verschmutzung des halbgereinigten Wassers erwarten ließ), dann aber plötzlich ohne nachweisbaren Grund zu blähen anfing, wobei sich nur noch Fadenbakterien entwickelten (Abb. 2).



Abb. 2.
Mikroskopisches Bild von Abb. 1. Vergr. 80.

Über die Organismen des Blähschlammes.

Aus dieser Erkenntnis heraus habe ich diese *Fadenbakterien* eingehend untersucht, in der Hoffnung, in ihren Eigenschaften eine Erklärung für ihre zeitweise abnorm starke Entwicklung zu finden.

In ihrer oben erwähnten Arbeit haben *Ruchhoft* und *Watkins* glucosehaltigen Peptonagar zur Züchtung verwendet. Meiner Erfahrung nach liefert der Blähschlamm darauf eine so große Menge Kolonien anderer *Bakterien*, *Pilze*, *Oospora* u. a. m., daß das Auffinden der Fadenbakterien sehr erschwert wird. Ich habe deshalb als Grundsubstanz das halbgereinigte Abwasser benutzt, worin die Fadenbakterien so üppig wuchsen, und außerdem noch kleine Mengen ($^1/_{20}$ bis $^1/_{50}$%) Pepton und Glucose zugesetzt, sowie 2% Agar. Hierauf wuchsen die gesuchten Bakterien viel besser (Abb. 3), so daß es möglich war, sie durch wiederholte Passagen von Begleitbakterien zu reinigen. Sie bildeten dann ziemlich langsam wachsende graue Kolonien von etwa 1 bis 1,5 mm Durchmesser. Werden diese in steriles Abwasser mit 0,1% Glucose und ebensoviel Pepton übertragen, so bildet sich darin bei 20 bis 25° C ein wattenartiges Flöckchen, welches auf dem Boden der Röhre bleibt

und die überstehende Flüssigkeit vollkommen klar läßt (eine etwaige Trübung zeigt mit Sicherheit eine Infektion mit Bakterien an). Wird das Röhrchen stark geschüttelt, so wird das Flöckchen zwar zerstört, hat sich aber nach $^1/_2$ Stunde Ruhe neu gebildet, und die Flussigkeit ist wieder klar geworden. Die Fäden sehen bei schwacher Vergrößerung aus wie die Abb. 4 zeigt, ein gefärbtes Präparat (1500fach) bietet das Bild der Abb. 5, durchaus ähnlich den Abbildungen von *Ruchhoft* und *Watkins*. Vielfach aber nimmt der Organismus im Schlamme eine andere Gestalt an, er gleicht nämlich einer Kette von Würstchen (Abb. 6), so daß man im Zweifel sein konnte, ob nicht ein anderer Organismus vorliegt, wenn nicht im selben Praparat auch Stellen vorkämen wie in Abb. 7, wo offenbar der gleiche Faden beide Bilder aufweist. In den Reinkulturen habe ich aber die Wurstchenform niemals beobachtet.



Abb. 3.
Wachstum der Fadenbakterien auf Abwasseragar mit 0,1 % Glucose. Junges Stadium. Vergr. 96.



Abb. 4.
Reinkultur der Fadenbakterien. Wasserpräparat. Vergr. 240.

Das Wachstum in zuckerfreien Flüssigkeiten, wie Bouillon, Pepton- oder Hefewasser, ist langsam, wird aber durch Hinzugabe verwendbarer Zuckerarten etwas gesteigert, besonders wenn Kreide anwesend ist, welche die gebildete Säure neutralisiert. Dementsprechend ist auch das Wachstum auf gewöhnlichem Agar nur zögernd, wird aber auffallend besser, wenn einige Prozente defibriniertes Blut hinzugegeben werden.

Übrigens scheint das Stickstoffbedürfnis nur gering zu sein, denn es fand auf einem Agar von Leitungswasser mit 0,1 % Glucose noch merkliches Wachstum statt. Stickstoff der Ammoniaksalze, Nitrate oder Harnstoff ändert daran nichts, Aminosäuren wie Glykokoll und Tyrosine sind dagegen in beschränktem Grade brauchbar.

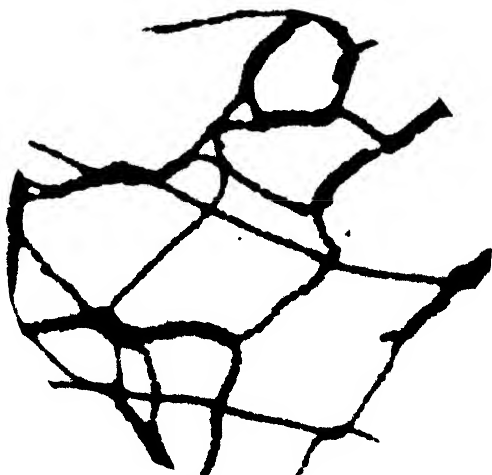


Abb. 5.
Reinkultur der Fadenbakterien. Gefärbtes Präparat. Vergr. 1200.

Optimale Verhältnisse der Temperatur und des Säuregrades liegen bei 20 bis 25° C und einem p_H zwischen 6 und 8, wie dies schon *Ruchhoft* und *Watkins* hervorgehoben haben.

Der Zuckerstoffwechsel.

Die Verarbeitung von Zucker war von erheblichem Interesse angesichts seiner blähungsfördernden Eigenschaften. In einer Lösung von 1 % Pepton und 0,1 % Glucose mit Kreide (in der optimales Wachstum stattfindet, indem nach 4 bis 5 Tagen der Zucker restlos verzehrt wird) wurden die Stoffwechselprodukte nach den üblichen Methoden bestimmt. Außer etwa 4 % Äthylalkohol wurden etwa 6 % Ameisensäure, 11 % Essigsäure und 53,5 % Milchsäure ermittelt, die zusammen 74,5 % des verschwundenen Zuckers darstellen. Trotz einem Überschuß an Kreide war der Organismus nicht imstande mehr als 0,2 bis 0,3 % Zucker zu verarbeiten, was die Aufstellung einer genauen Stoffwechsel-



Abb. 6.
Würstchenform im Blähschlamm. Gefärbtes Präparat. Vergr. 1200.

bilanz sehr erschwerte. Außer der Glucose werden auch Lävulose, Maltose, Galaktose, Mannit, Saccharose und Salicin verarbeitet. Glycerin und Arabinose sind dagegen ungeeignet.



Abb. 7.
Ubergang der kurzgliederigen in die Würstchenform. Vergr. 1200.



Abb. 8.
Tuschepräparat der Reinkultur. Vergr. 1200.

Das Verhalten gegen Sauerstoff ist dasjenige der fakultativ anaeroben Bakterien; in vollgefüllten und verschlossenen Flaschen findet ebenso gutes Wachstum statt wie bei vollem Luftzutritt. Trotzdem hat sich eine Beluftung der Kulturflussigkeit als ungunstig erwiesen, ein unerwartetes Ergebnis, wenn man in Betracht zieht, daß die Blahung auch bei voller Beluftung auftritt und nicht durch Verstarkung der Luftmenge zuruckzugehen scheint. Man muß daraus folgern, daß die Beluftung des Abwassers keine volle Sattigung mit Sauerstoff herbeizufuhren imstande ist, worauf auch die gunstige Auswirkung einer Wiederbeluftung des Rücklaufschlammes hinzudeuten scheint.

Die systematische Stellung des Organismus festzustellen, hat wider Erwarten viel Muhe gekostet. Bis jetzt hat man nur kurzweg von „*Sphaerotilus*“ gesprochen, ohne Beweise dafur beizubringen. *Ruchhoft* und *Watkins* zitieren die Meinung von *W. C. Purdy*, „that he believed it to be a variety of *Sphaerotilus*“, betonen aber deutlich die Unter-

schiede zwischen der Beschreibung in *Bergeys* Handbuch und den Eigenschaften der von ihnen isolierten Bakterien. Ich kann dies nur voll bestätigen. Man muß zugeben, daß die einzige Art dieser Gattung, *Sph. natans* (*Kützing*), nicht sehr scharf beschrieben ist [s. *Kolkwitz* (3), *Trommsdorf* (8), *Zikes* (9), *Naumann* (10)], aber die allgemeine Auffassung geht dahin, daß unverzweigte Fäden vorliegen von 2 bis 3 μ Breite, welche sehr selten Pseudodichotomie zeigen und aus zylindrischen oder ovalen Zellen bestehen, die innerhalb einer schwer färbbaren, oft nahezu unsichtbaren Scheide liegen. Die Fortpflanzung soll erfolgen durch unbewegliche oder bewegliche, meistens monotriche Konidien, die aus der Scheide herauswandern können.



Abb. 9.
Sphaerotilus natans aus Flußwasser. Wasserpräparat. Vergr. 240.

Nach *Ruchhofts* wie nach meinen Befunden beträgt die Breite der Fäden nur 1,2 bis 1,5 μ. Pseudodichotomie tritt *nie* auf, weder im Belebtschlamm noch in den Reinkulturen; auch bewegliche Schwärmer konnten niemals wahrgenommen werden. Eine Scheide läßt sich weder in wässerigen noch in gefärbten Präparaten nachweisen. Auch am Tuschepräparat (Abb. 8) läßt sich die Frage nicht entscheiden. Man sieht zwar keine Scheide, aber an manchen Stellen liegen die einzelnen Zellen so weit voneinander entfernt, daß man wohl



Abb. 10.
Gefärbtes Präparat der Abb. 9. Deutliche Scheide. Vergr. 1200.

das Vorhandensein einer gemeinsamen Hülle annehmen muß, die eine Scheide genannt werden könnte, obgleich sie nicht sichtbar gemacht werden kann. Ganz anders liegen die Verhältnisse bei *Sphaerotilus*, der in verschmutzten öffentlichen Gewässern vorzukommen pflegt[1]. Zwar sieht dieser dem Schlammorganismus ziemlich ähnlich, aber schon im Wasserpräparat (Abb. 9) und noch deutlicher im gefärbten Zustande (Abb. 10) ist eine Scheide sichtbar, welche die Konidien umschließt. Einen weiteren Unterschied bietet das Entwicklungsbild in flüssigen Kulturen. Unser Organismus wächst in einer klaren Flüssigkeit wie ein weißer Wattebausch, welcher nirgends anhaftet, sondern immer frei von der Glaswand bleibt. Der *Sphaerotilus* aus freier Natur aber haftet an der Wand der Gefäße wie an Blättern oder Steinen in den Gewässern, wo er vom Strom bewegte Buschel bildet. Frei schwimmende Flocken bildet er nicht, jedoch die Glaswand bedeckt sich allmählich mit einer anhaftenden Schicht. Bis jetzt ist es uns nicht gelungen, diesen „echten“ *Sphaerotilus* auf festen Nahrböden zu züchten: es entwickeln sich nur Bakterien.



Abb. 11.
Cladothrix dichotoma im Blähschlamm. Vergr. 100.

Es ist also in hohem Grade unwahrscheinlich, daß die beiden Organismen identisch sind. Falls man den Bewohner des Blähschlammes trotzdem in die Gattung *Sphaerotilus* einreihen will, wofur in der Tat manches spricht, so wäre man doch zur Schaffung einer neuen Spezies gezwungen, für die ich vorläufig den Namen *Sph. paludosus* vorschlagen möchte.

Noch andere Organismen haben in Verbindung mit der Schlammblähung unsere Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Wenn nämlich dem wie oben beschrieben mit Na_2S behandelten Schlamm von neuem Abwasser mit 0,1 bis 0,2 % Zucker zugesetzt wurde, so stellte sich bald

---

[1] Der Freundlichkeit des Herrn *Ir. J. O. Elema* in Assen (Holland) verdanke ich eine Rohkultur dieses Organismus.

eine Blähung ein, aber die ursächlichen Organismen hatten in diesem Falle die Gestalt der *Cladothrix dichotoma* (*Cohn*). Wie die Abb. 11 dartut, sind jetzt die dichotomen Verzweigungen reichlich vorhanden, und man bekommt den Eindruck, daß es sich um einen anderen Organismus handelt wie in dem gewöhnlichen Blähschlamm oder in den Flüssen, in Widerspruch zu den Ausführungen *Naumanns* (11), der die Identität des *Sphaerotilus natans* mit *Cladothrix* befürwortet. Es hat uns nicht gelingen wollen, diesen Organismus auf festen Substraten zu züchten, so daß sich in dieser Frage keine Entscheidung herbeiführen läßt.



Abb 12.
Geotrichoides paludosus im Schlamm. Vergr. 120

Ein dritter Organismus hat noch unsere Aufmerksamkeit erregt, dessen Wachstum im Schlamme in der Abb. 12 festgelegt worden ist. Er zeichnete sich durch eine üppige Entwicklung auf unseren Platten aus und hatte in der Reinkultur das Aussehen länglicher Hefezellen. Die Fäden zerfallen offenbar leicht in oidiumartige Teilstücke. Das „Centraal Bureau voor Schimmelcultures" in Baarn hat ihn als eine unbekannte Art der Gattung *Geotrichoides* [*Langeron* et *Talice* (12)] erkannt, für die ich bis auf weiteres den Namen *Geotrichoides paludosus* vorschlage. Mit der normalen Blähung hat er offenbar nichts zu tun.

Zusammenfassung.

Die Schlammkrankheit, die als Blähung oder „bulking" bekannt und gefürchtet ist, wird durch ein abnormes Wachstum von *Fadenbakterien* verursacht. Obwohl die Erscheinung hervorgerufen werden kann durch eine dauernde Zugabe kleiner Mengen (0,1 bis 0,2 %) Zucker oder Stärke, muß die Ursache des plötzlichen und unerwarteten Auftretens der Krankheit in Kläranlagen nach dem Belebtschlammverfahren anderswo gesucht werden, da Stärke und Zucker nur in vollkommen unschädlicher Menge im Abwasser vorzukommen pflegen. Verbindungen irgendwelcher Art, welche, wie der Zucker, die Krankheit auslösen können, sind bisher nicht gefunden worden. Das im Blähschlamm vorkommende Fadenbakterium wurde rein gezüchtet und näher untersucht, wobei sich herausstellte, daß es sich, entgegen der bisherigen

Annahme, wahrscheinlich nicht um *Sphaerotilus natans* (*Kützing*) handelt. Es wird der vorläufige Name *Sph. paludosus* vorgeschlagen. Außerdem werden zwei andere Organismen beschrieben, welche sich gelegentlich im Blähschlamm zeigen können. Es bleibt weiterem Studium vorbehalten, die Ursachen zu erforschen, welche das massenhafte Auftreten des *Sph. paludosus* und damit die Blähung veranlassen können.

Ich möchte zum Schluß nicht verfehlen, meinem Assistenten, Herrn Dr. *W. Kauffmann*, für seine rege Mithilfe Dank zu sagen.

Literatur.

1) *W. Clifford* u. *M. E. D. Eldridge*, The Surveyor **82**, 75, 1932. — 2) *G. J. Fowler*, ebenda **82**, 223, 1932. — 3) *R. Kolkwitz*, Lafars Handb. d Techn. Mycologie **8**, 461; Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **46**, 36, 1928. — 4) *W. Scott*, The Surveyor **78**, 345, 1928. — 5) *C. C. Ruchhoft* u. *J. H. Watkins*, Sewage Works J. **1**, 52, 1928. — 6) *Jan Smit*, ebenda **4**, 960, 1932. — 7) *Fr. Schmiedt*, Techn. Gemeindebl. **35**, 169, 1932. — 8) *R. Trommsdorff*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **48**, 62, 1918. — 9) *H. Zikes*, ebenda **43**. 529, 1915. — 10) *E. Naumann*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **50**, 558, 1932. — 11) *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II. Abt. **88**, 62, 1933. — 12) *M. Langeron* u. *R. V. Talice*, Ann. de Parasitol. **10**, 62, 1932.

Über die Bedeutung des Kaliums im Stoffwechsel von Aspergillus niger.

Von

August Rippel und Georg Behr.

(Eingegangen am 22. Oktober 1934.)

Die Tatsache, daß Kalium für die Heterotrophen ebenso notwendig ist wie für die autotrophen grünen Pflanzen, würde bedeuten, daß jene ein günstigeres Versuchsobjekt abgeben müßten, da die Wirkung unabhängig von der Photosynthese ist. Wir haben daher Versuche an *Aspergillus niger* in Angriff genommen.

1. Kalimangel und Oxalsäurebildung.

Molliard[1] hatte bereits festgestellt, daß bei Kalimangel viel stärker Oxalsäure gebildet wird als bei guter Versorgung mit Kalium. Bei dem außerordentlich wechselnden Verhalten des Pilzes war eine Nachprüfung wünschenswert. Tabelle I zeigt das Verhalten zweier Stämme auf physiologisch saurem Substrat. Der *Stamm Göttingen alt* bildet (wie auch *Stamm Zwetsche* und *Stamm Fulda*, vgl. Tabelle VIII) normalerweise wenig Oxalsäure; auf Nitratnährlösung (physiologisch alkalisch) wird die Lösung nach dem Zuckerverbrauch alkalisch, die einsetzende Autolyse ist von dem Auftreten eines in alkalischer Lösung violetten Farbstoffs und weiterhin einer huminartigen Braunfärbung begleitet. *Stamm Berlin* und *Stamm Göttingen neu* bilden dagegen stets viel Oxalsäure; die physiologisch alkalische Lösung bleibt sauer; es tritt saure, nur von schwacher Gelbfärbung begleitete Autolyse ein (vgl. *Behr*[2]).

Stamm Berlin zeigt das von *Molliard* beschriebene Verhalten (Tabelle I), nämlich viel mehr Oxalsäure bei schlechter Kaliversorgung, wie besonders deutlich wird, wenn man die je 1 g Mycel gebildete Menge an Oxalsäure berechnet. Es kann sich nicht darum handeln, daß bei guter Kaliversorgung die gebildete Oxalsäure gleich wieder weiter verarbeitet wird, da das erreichte Maximum an Oxalsäure je 1 g Mycel, obwohl noch Zucker vorhanden ist, nicht einmal an das Minimum bei der schlechten Kaliversorgung heranreicht. Hierauf wird gleich noch weiter zurückzukommen sein. *Stamm Göttingen alt* zeigt dasselbe, wenn auch weniger ausgeprägt; hier ist bei guter Kaliversorgung überhaupt keine Oxalsäure gebildet, bei schlechter immerhin eine einwandfrei feststellbare Menge.

Einen weiteren Versuch, den Tabelle II zeigt, führten wir nun mit dem *Stamm Göttingen alt* auf physiologisch alkalischer Nährlösung durch.

[1] *M. Molliard*, C. r. Acad. Sc. 170, 949, 1920. — [2] *G. Behr*, diese Zeitschr. 1, 418, 1930.

Tabelle I.

Alter der Kultur	Mit Kalium					Ohne Kalium				
Tage	Mycel g	p_H	Oxalsäure g	Oxalsäure g je 1 g Mycel	Zucker	Mycel g	p_H	Oxalsäure g	Oxalsäure g je 1 g Mycel	Zucker
					Stamm Göttingen alt.					
4	0,784	1,47	0	0	+	0,043	3,55	0	0	+
7	1,970	0,97	0	0	+	0,074	2,82	0	0	+
13	2,579	1,07	0	0	+	0,131	2,72	0,002	0,015	+
28	2,526	1,06	0	0	—	0,198	2,31	0,005	0,025	+
41	2,516	1,31	0	0	—	0,226	2,27	0,009	0,040	+
58	2,490	1,31	0	0	—	0,298	1,94	0,020	0,067	+
					Stamm Berlin.					
4	1,124	1,32	0,006	0,005	+	0,051	3,04	0	0	+
7	1,782	0,95	0,054	0,030	+	0,082	2,72	0,013	0,157	+
13	2,201	1,01	0,068	0,031	+	0,127	2,48	0,018	0,142	+
28	2,273	0,95	0,040	0,018	—	0,215	2,01	0,044	0,205	+
41	2,180	1,18	0,007	0,003	—	0,251	1,89	0,058	0,231	+
58	2,125	1,18	0	0	—	0,319	1,49	0,140	0,439	+

Nährlösung: Handelsrohrzucker 10%; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0%; Na_2HPO_4 0,25%; $MgSO_4$ 0,125%; $ZnSO_4$ 0,005%; K_2SO_4 0 bzw. 0,20%. 75 ccm in 250er *Erlenmeyer*-Kölbchen. Anfangs-p_H 6,3. Geimpft 9. Dezember 1930. Temperatur 28 bis 30° C.

Während also bei „Mit Kalium" Oxalsäure erst bei annähernder Neutralität auftritt, ist sie bei „Ohne Kalium" bereits im sauren Gebiet vorhanden, besonders deutlich wieder bei Umrechnung auf 1 g Mycel. In einem weiteren, aus Raumgründen hier nicht mitgeteilten Versuch, der dieses Ergebnis bestätigt, fanden wir bei „Mit Kalium" (0,20% K_2SO_4) bei p_H 4,27 und einem Mycelgewicht von 1,727 g 0,014 g Oxalsäure, mit „Wenig Kalium" (0,01 % K_2SO_4) bei p_H 3,80 und einem Mycelgewicht von 1,004 g 0,009 g Oxalsäure, während „Ohne Kalium" bei p_H 3,46 bzw. 4,67 und einem Mycelgewicht von 0,308 bzw. 0,329 g 0,044 bzw. 0,196 g Oxalsäure ergaben.

Im Versuch der Tabelle II bestimmten wir auch die Gluconsäure; Citronensäure fehlte vollständig.

Für die Gluconsäure sind zwei Spalten angegeben. In der ersten geben wir die Gluconsäure an, die sich aus der Menge des in der abfiltrierten Lösung aus zugesetztem $CaCO_3$ in Lösung gegangenen Calciums errechnet. Hierbei kann es sich indessen nur um die *freie* Gluconsäure handeln. Oxalsäure wird dabei nicht mit erfaßt, da die Lösung noch sauer reagiert, Oxalsäure also als Ca-Oxalat ausfallen muß.

Um nun auch die gebundene Gluconsäure zu erfassen, hätten wir diese durch Ausfällen in Alkohol bestimmen können, hatten aber mit dieser Methode ganz unbefriedigenden Erfolg, selbst bei Testversuchen mit reiner Gluconsäure. Infolgedessen errechneten wir die gebundene Gluconsäure auf folgende Weise: Wir bestimmten den Verbrauch an Nitratstickstoff

Tabelle II.

Alter Tage	Mycel g	p_H	Gluconsäure frei g	Gluconsäure korrigiert g	Oxalsäure g	Oxalsäure g je 1 g Mycel
			Mit Kalium.			
4	0,103	3,72	0,150	0,205	0	0
8	0,783	3,18	0,290	0,704	0	0
14	1,011	6,01	0,074	0,533	0,005	0,005
18	1,048	7,10	0	0,248	0,091	0,090
28	0,635	7,30	0	0,078	0,170	0,268
50	0,555	7,43	0	0	0,198	0,357
			Ohne Kalium.			
4	0,043	3,14	0,150	0,175	0	0
8	0,232	3,36	0,240	0,342	0	0
14	0,183	0,81	0,361	0,516	0,008	0,044
18	0,267	1,02	0,400	0,545	0,006	0,023
28	0,288	3,20	0,480	0,621	0,006	0,021
50	0,464	2,81	0,179	0,359	0,086	0,185

Nährlösung: Handelsrohrzucker 5%; $NaNO_3$ 0,33%; $MgSO_4$ 1,0%; $ZnSO_4$ 0,005%; Na_2HPO_4 0,20%; K_2SO_4 0 bzw. 0,20%. Anfangs-p_H 6,23 bei ohne, 6,29 bei mit Kalium. 75 ccm in 250er *Erlenmeyer*-Kölbchen. Temperatur 28 bis 30° C. Geimpft 18. August 1930.

sowie das in späteren Stadien gebildete, in dem Substrat vorhandene Ammoniak. Bei der Nitratverarbeitung wird Natrium frei, das gebildete Gluconsäure neutralisiert; ebenso neutralisiert das entstehende Ammoniak. Aus beiden Zahlen ergibt sich das Äquivalent an Gluconsäure. Von dem so gefundenen Wert wurde nun der Äquivalentwert der ermittelten Oxalsäure abgezogen. Wo freie Gluconsäure vorhanden war, wurde diese in der Spalte der korrigierten Werte natürlich vorher zur errechneten hinzu addiert. Selbstverständlich kann diese Methode nicht genau sein, dürfte aber für Vergleichswerte genügen. Insbesondere sei noch darauf hingewiesen, daß sie natürlich nicht brauchbar ist, wenn die Oxalsäure wieder abnimmt, was aber bei vorliegendem Versuch nicht der Fall war.

Der Versuch zeigt wiederum, daß Oxalsäure bei „Wenig Kalium" im sauren Gebiet auftritt, sowie ferner, daß sie mit dem Beginn des Schwindens der Gluconsäure erscheint, womit die alte Erfahrung bestätigt ist, daß die Oxalsäure die Endstufe im Säurestoffwechsel von *Aspergillus* darstellt, was für unsere weiteren Ausführungen wichtig ist. Es geht weiterhin daraus hervor, daß die Oxalsäure nicht etwa deshalb bei „Viel Kalium" zurücktritt, weil sie nach dem Entstehen sofort wieder weiter verarbeitet würde. Denn solange die Gluconsäure noch zunimmt, also nicht verarbeitet wird, erscheint es ausgeschlossen, daß gebildete Oxalsäure verarbeitet werden sollte. Immerhin setzten wir noch einen besonderen Versuch in dieser Richtung an, indem wir von vornherein freie Oxalsäure der Nährlösung zusetzten, wobei sich bei *Stamm Göttingen alt* folgendes ergab:

Tabelle III.

	Ohne Oxalsäure	Mit Oxalsäure	Mit Schwefelsäure
Kulturdauer 0 Tage.			
p_H	4,27	2,58	2,60
mg Oxalsäure gesamt	—	78,0	—
Kulturdauer 3 Tage.			
Mycel in g	0,503	0,424	0,741
p_H	4,69	4,26	4,84
mg Oxalsäure gesamt	4,6	84,6	4,3
„ „ gebildet	4,6	6,6	4,3
Kulturdauer 6 Tage.			
Mycel in g	1,337	1,405	1,719
p_H	4,15	4,26	4,23
mg Oxalsäure gesamt	49,7	122,6	58,5
„ „ gebildet	49,7	44,6	58,5
Kulturdauer 9 Tage.			
Mycel in g	1,953	2,131	2,311
p_H	4,22	4,36	5,38
mg Oxalsäure gesamt	172,3	240,5	224,3
„ „ gebildet	172,3	162,5	224,3

Nährlösung: Handelsrohrzucker 10 %; $NaNO_3$ 1,3 %; KH_2PO_4 0,05 %; $MgSO_4$ 0,125 %; $ZnSO_4$ 0,005 %. Zusatz 0 bzw. 78 mg Oxalsäure (2 Moleküle Wasser) bzw. 1 ccm Schwefelsäure 1 : 5. 75 ccm Nährlösung in 250er Kölbchen. Temperatur 28 bis 30° C. Geimpft 21. Juni 1933.

Es ist also bei vorherigem Zusatz von Oxalsäure ebensoviel Oxalsäure neugebildet wie ohne diesen Zusatz, und die zugesetzte Oxalsäure ist vollständig erhalten geblieben. Der Vergleichsversuch mit von vornherein zugesetzter Schwefelsäure zeigt, daß die Änderung der Wasserstoffionenkonzentration keinen Einfluß hatte. Daß hier die Zahlen bei 6 und 9 Tagen noch höher liegen als in den beiden anderen Fällen, erklärt sich aus dem höheren Mycelgewicht, wonach also die Schwefelsäurekultur physiologisch älter war. Auffallend ist hier die hohe Oxalsäurebildung überhaupt; der *Stamm Göttingen alt* ging nämlich im Laufe der Zeit zu immer stärkerer Oxalsäurebildung über (vgl. S. 570).

2. Kalimangel und Stickstoff-Stoffwechsel.

Schmalfuss[1] hatte bei *Hafer* eine Störung des Eiweißstoffwechsels unter Kalimangel festgestellt, die wir[2] für *Hafer* und *Kartoffeln* bestätigen konnten. Für Pilze liegen noch keine diesbezüglichen Angaben vor, da *Schmalfuss* nur einen Versuch erwähnt mit Acetamid als N-Quelle,

[1] *K. Schmalfuss*, Phytopathol. Zeitschr. 5, 207, 1932. — [2] *A. Rippel, G. Behr* u. *R. Meyer*, Zeitschr. f. Pflanzenern. A. 32, 95, 1933.

aus dem nicht viel zu entnehmen ist. Bei unseren Untersuchungen an *Aspergillus niger*, *Stamm Göttingen alt*, fanden wir z. B. folgendes (Tabelle IV).

Tabelle IV.

	Mycel g	p_H	In der Mycel-Trockensubstanz K_2O %	Na_2O %	Gesamt-N %	Eiweiß-N %	NH_3-N %	Eiweiß-N in % des Gesamt-N
Mit Kalium	1,50	3,71	1,33	0,57	3,86	2,83	0,27	73,3
Ohne „	0,25	4,14	0,08	0,35	5,44	2,68	1,47	49,3

Nährlösung: Zucker 10%; $NaNO_3$ 1,3%; Na_2HPO_4 0,2%; $MgSO_4$ 1,0%; $ZnSO_4$ 0,005%; Citronensäure 0,1%; K_2SO_4 0 bzw. 0,2%. 50 ccm Nährlösung in 250er Kölbchen. Temperatur 28 bis 30° C. Impfung 7. Mai 1932. Kulturdauer 4 Tage.

Die Ammoniakzahlen, die aus dem Filtrat der Eiweißbestimmung durch Destillation mit Magnesia ermittelt wurden, kontrollierten wir durch Ausschütteln des Mycels mit Kochsalzlösung und kolorimetrische Bestimmung, wobei sich die Werte 0,14% für +-Kalium und 1,20% für —-Kalium ergaben. Es zeigt sich also, daß das K-arme Mycel ganz erheblich mehr Ammoniak hatte als das reichlich mit Kalium versorgte. Ein weiterer Versuch, in dem auch die N-Formen des Substrats bestimmt wurden, ergab ein gleiches (Tabelle V).

Tabelle V.

	Mycel g	p_H	Gesamt-N %	Eiweiß-N %	NH_3-N	Eiweiß-N in % des Gesamt-N
Mit Kalium.						
Kulturdauer 4 Tage						
Mycel	0,48	—	3,84	3,22	0,15 %	83,9
Substrat					0,05 mg	
Kulturdauer 7 Tage						
Mycel	0,54	—	3,49	2,99	0,06 %	85,7
Substrat		5,57			0,38 mg	
Ohne Kalium.						
Kulturdauer 7 Tage						
Mycel	0,074	—	4,73	3,21	0,21 %	67,8
Substrat		3,95			0,16 mg	

Nährlösung: Rohrzucker 3%; $NaNO_3$ 2,8%; NaH_2PO_4 0,025%; $MgSO_4$ 0,025%; $CaSO_4$ 0,025%; Fe_2Cl_6 Spur; NaCl 0,05%; KCl 0 bzw. 0,05%. 50 ccm Lösung in 250er Kölbchen. Temperatur 28 bis 30° C. Geimpft 16. November 1931.

Es ist dabei auffallend, daß die Unterschiede zwischen + K und — K im Substrat nicht hervortreten bzw. sich sogar umkehren können. Auch bei weiteren Versuchen fanden wir nur in späteren Entwicklungs-

stadien ein geringes Mehr an NH_3-N im Substrat K-armer Kulturen, nämlich 0,73 und 0,95 mg gegen 0,32 und 0,38 mg in K-reichen Kulturen bei annähernd gleichem, um 4 liegenden p_H-Wert.

Das Ammoniak tritt im Mycel der K-armen Kulturen so stark in Erscheinung, daß der Eiweißanteil erheblich niedriger liegt als in K-reichen Kulturen. Bei höheren Pflanzen war dies weder bei den Versuchen von *Schmalfuss* noch bei eigenen der Fall, da der NH_3-Gehalt im Vergleich zum Eiweißgehalt *absolut* so gering war, daß er sich in dieser Richtung kaum auswirken konnte, wenn auch die Tatsache des höheren NH_3-Gehalts bei K-Mangel dort ebenfalls hervortritt.

Die Entstehung des Ammoniaks kann auf zweierlei Art erfolgen: Entweder unmittelbar durch Reduktion der Nitrate oder durch Autolyse des bereits organisch festgelegten Stickstoffs. Zunächst möchte man der ersten Auffassung zuneigen, da die NH_3-Anhäufung im K-armen Mycel auf einer Stufe sehr geringer Mycelproduktion erfolgt, wie die Übersichten oben zeigen, auch *Schwartz*[1] zeigen konnte, daß sehr frühzeitig in der Lösung eine Verarbeitung der Nitrate eintritt. Aber andererseits könnte die starke NH_3-Anhäufung gerade *in* den Zellen auf die zweite Möglichkeit hindeuten, wenn man nicht annehmen will, daß die Mehraufnahme von NH_3 zwangsmäßig infolge der bei K-Mangel verminderten Basenzufuhr erfolgt, was indessen wenig wahrscheinlich ist. Denn bei obigem Versuch hatten wir absichtlich einen sehr großen Überschuß von Na und Mg gegeben, weshalb eher ein Kationenaustausch (NH_3 aus der Zelle in das Substrat) zu erwarten gewesen wäre.

Daß eine Autolyse sich auch in saurer Lösung, wie sie oben vorlag, vollziehen kann, hat der eine von uns (*Behr*[2]) gezeigt. Schwierig wäre es allerdings, sich vorzustellen, daß eine Autolyse sich bereits bei so jungem Mycel einstellen sollte. Das kann hier nicht entschieden werden. Jedoch sei auf einen Gesichtspunkt aufmerksam gemacht, den wir[3] kürzlich herausstellten: Wir kamen dort zu dem Schluß, daß bisher noch kein Grund vorliegt, eine Beteiligung des Kaliums bei dem Umsatz der Kohlenhydrate abzulehnen. Wir legten dort noch besonderen Wert auf den Ausdruck „Umsatz“, da bei Heterotrophen eine Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäure wohl ausscheidet, die Bedeutung des Kaliums aber ebenso groß ist wie bei Autotrophen. Alle Erscheinungen des K-Mangels zeigten auch die Erscheinungen eines N-Überschusses, wie auch *Schmalfuss* feststellte.

Es wäre demnach durchaus denkbar, daß der durch N-Überschuß forcierte N-Stoffwechsel schon in einem sehr frühen Wachstumsstadium zu einer Art „Alterserscheinung“ führt, die mit einem Eiweißabbau verbunden ist. Vielleicht liegen auch die Verhältnisse so wie es bei höheren Pflanzen schon unmittelbar makroskopisch zu beobachten ist: Bei Mangel vergilben die älteren Blätter frühzeitig, und der darin enthaltene Mangelnährstoff wird in jüngere Teile transportiert, um dort weiter zum Aufbau zu dienen, so daß also praktisch genommen der

[1] *W. Schwartz* u. *H. Steinhart*, diese Zeitschr. 4, 301, 1933. — [2] *G. Behr*, ebenda 1, 418, 1930. — [3] Zit. S. 564, Anm. 2.

ältere Teil der Pflanze unter den Erscheinungen des Eiweißabbaues stände, der sich naturgemäß einstellen müßte, wenn etwa durch Herausziehen des Kaliums nicht mehr die Bedingungen des jugendlichen Stoffwechsels gegeben wären. Daß ferner in der Pflanze Eiweißaufbau und Eiweißabbau nebeneinander hergehen und in ihrem gegenseitigen Gleichgewicht von gewissen Faktoren (Sauerstoff) bestimmt werden, hat *Mothes* ausgeführt (vgl. dazu weiter unten). Jedenfalls ist es, wenn auch nicht bewiesen, so doch keineswegs ausgeschlossen, daß die Entstehung des Ammoniaks in K-armem Mycel durch Autolyse zu erklären ist.

8. Kalimangel und ökonomischer Koeffizient.

Wenn viele Versuche[1] ergeben hatten, daß bei K-Mangel höhere Pflanzen weniger Kohlenhydrate enthalten als reichlich mit K versorgte Pflanzen, so war bei Pilzen ein entsprechender Unterschied im ökonomischen Koeffizienten (ö. K.) zu erwarten in dem Sinne, daß vielleicht K-arme Mycelien unökonomischer arbeiten würden als normale. Das Ergebnis diesbezüglicher Versuche ist in den beiden Tabellen VI und VII niedergelegt.

Es ist also tatsächlich der ö. K. bei schlechter Versorgung mit Kalium niedriger als bei guter[2]. Hierbei muß aber berücksichtigt werden, daß, wie die Tabellen zeigen, auch bei schlechter Stickstoffversorgung im Vergleich zu guter qualitativ die gleiche Erscheinung auftritt. Zwar ist die Depression bei Kalimangel in quantitativer Hinsicht augenscheinlich erheblich stärker als bei Stickstoffmangel; aber es könnten doch Zweifel bestehen, ob es sich nicht um eine allgemeine Mangelerscheinung handelt, wie denn auch schon von anderen Autoren festgestellt wurde, daß der ö. K. bei langsamem Wachstum niedriger sein soll als bei gutem, was indessen nicht immer zutrifft. Denn *Flieg*[3] fand bei Fett als einziger C-Quelle, trotz sehr langsamen Wachstums, für *Aspergillus niger* einen hohen ö. K. (um 0,70) während der ganzen Entwicklungszeit. Es spielt also weniger die mehr oder weniger große Angreifbarkeit der C-Quelle eine Rolle als ihre Eignung überhaupt. Diese Eignung wird aber abhängen von den die Verarbeitung begleitenden Umsetzungen.

[1] Siehe S. 564, Anm. 2. — [2] Auch *P. Bretin*, *P. Manceau* u. *J. Cochet* (C. r. Soc. Biol. 106, 195, 1931) stellten bei *Penicillium* höheren Zuckerverbrauch mit abnehmender K-Versorgung fest, ferner Abnahme der Phytosterin- und Zunahme der Lecithinbildung. Doch lassen die Zahlen keinen eindeutigen Schluß zu, da K als KNO_3 gegeben, somit auch die N-Konzentration variiert wurde, wobei allerdings noch Ammoniumnitrat in der Grundlösung gegeben war. — [3] *O. Flieg*, Jahrb. f. wissensch. Bot. 61, 24, 1922.

Tabelle VI.

	Mycel-gewicht g	Verbrauchte Glucose	Mycel je 1 g verbrauchte Glucose	Mycel je 1 g verbrauchte Glucose, korrigiert	Säure n/25 ccm
Alter 45 Std.					
viel N, + K . .	0,0322	0,077	0,42	—	2,2
„ N, — K . .	0,0194	0,055	0,35	0,38	2,8
wenig N, + K . .	0,0224	0,058	0,39	0,45	3,2
„ N, — K . .	0,0158	0,048	0,33	—	3,1
Alter 69 Std.					
viel N, + K . .	0,1013	0,233	0,43	—	2,0
„ N, — K . .	—	—	—	—	—
wenig N, + K . .	0,0555	0,153	0,36	0,45	5,8
„ N, — K . .	—	—	—	—	—
Alter 117 Std.					
viel N, + K . .	—	—	—	—	—
„ N, — K . .	0,0601	0,220	0,27	0,32	6,1
wenig N, + K . .	—	—	—	—	—
„ N, — K . .	0,0509	0,217	0,23		10,5
Alter 126 Std.					
viel N, + K . .	0,1426	0,362	0,39	—	1,0
„ N, — K . .	—	—	—	—	—
wenig N, + K . .	0,0828	0,316	0,26	0,42	16,0
„ N, — K . .	—	—	—	—	—
Alter 8 Tage					
viel N, + K . .	—	—	—	—	—
„ N, — K . .	0,0839	0,342	0,24	0,28	7,0
wenig N, + K . .	—	—	—	—	—
„ N, — K . .	0,0582	0,284	0,20	—	12,5
Alter 14 Tage					
viel N, + K . .	—	—	—	—	—
„ N, — K . .	0,0690	0,362	0,19	—	2,4
wenig N, + K . .	0,0804	0,362	0,22	—	12,0
„ N, — K . .	0,0663	0,362	0,18	—	14,0

0,362 g Glucose im Kolben.

Nährlösung: 0,5% Glucose; 0,03% Na_2HPO_4; 0,05% $MgSO_4$, 0,005% $ZnSO_4$; 0,01% Citronensäure; 0,12 bzw. 0,01% $NaNO_3$, 0,025 bzw. 0% K_2SO_4. 75 ccm in 250er Kölbchen. Impfung 8. Juni 1933. Temperatur 28 bis 30° C.

Im vorliegenden Falle läßt sich nun die Depression im ö. K. bei Stickstoffmangel befriedigend erklären. In Tabelle VI sind in der letzten Spalte die Titrationswerte der Kulturlösungen angegeben, wobei die besonders hohen Zahlen bei „Wenig Stickstoff“ auffallen. Es kann sich dabei nur um Gluconsäure handeln, da Citronensäure von unserem Stamm überhaupt nicht gebildet wurde und Oxalsäure, wie Tabelle II zeigt, erst in einem viel späteren Lebensstadium auftritt. Überdies ist durch *Molliard*[1] und *Bernhauer*[2] bekannt geworden, daß Stickstoffmangel gerade die Gluconsäurebildung (und Citronensäurebildung) fördert. Bei eigenen, hier nicht

[1] *M. Molliard*, C. r. Acad. Sc. 174, 881, 1922. — [2] *K. Bernhauer*, Biochem. Zeitschr. 197, 287, 1928.

näher beschriebenen Versuchen fanden wir jedenfalls bei Stickstoffmangel ebenfalls keine Oxalsäure bei starker Gluconsäurebildung. Der ö. K. wird hierdurch, vom energetischen Gesichtspunkt aus, natürlich stark beeinflußt, da die Gluconsäure noch einen im Vergleich zur Glucose unwesentlich verringerten Energiegehalt besitzt. Bei Bestimmung der Glucose wird aber die Gluconsäure nicht mit erfaßt, so daß, energetisch betrachtet, zuviel Zucker als verbraucht gefunden wird.

Tabelle VII.

	Mycel-gewicht g	Verbrauchte Glucose	Ökonomischer Koeffizient		Mycel-gewicht g	Verbrauchte Glucose	Ökonomischer Koeffizient
Alter 2 Tage				6 $NaNO_3$ — K	0,018	0,111	0,16
6 $NaNO_3$ + K	0,171	0,432	0,39	0,1 „ + K	0,080	0,312	0,25
6 „ — K	—	—	—	0,1 „ — K	0,015	0,134	0,11
0,1 „ + K	0,061	0,186	0,33	Alter 7 Tage			
0,1 „ — K	—	—	—	6 $NaNO_3$ + K	0,662	2,978	0,22
Alter 4 Tage				Alter 23 Tage			
6 $NaNO_3$ + K	0,566	1,514	0,37	6 $NaNO_3$ — K	0,025	0,173	0,14
6 „ — K	—	—	—	0,1 „ + K	0,089	0,323	0,27
0,1 „ + K	0,074	0,273	0,27	0,1 „ — K	0,020	0,173	0,12
0,1 „ — K	—	—	—	Alter 47 Tage			
Alter 6 Tage				6 $NaNO_3$ — K	0,037	0,301	0,12
6 $NaNO_3$ + K	0,582	1,958	0,30	0,1 „ — K	0,034	0,335	0,10

3,578 g Glucose im Kolben.

Nährlösung: 5% Glucose; 0,15% Na_2HPO_4; 0,5% $MgSO_4$; 0,005% $ZnSO_4$; 0,05% Citronensäure; 0,6 bzw. 0,03% $NaNO_3$; 0,20 bzw. 0% K_2SO_4. 75 ccm in 250er Kölbchen. Geimpft 14. Dezember 1932. Temperatur 28 bis 30° C.

Man kann nun folgende Überschlagsrechnung anstellen: Für die Lösungen mit wenig N berechnet man nach dem Unterschied der Titrationswerte gegenüber „Viel N“ die mehr gebildete Gluconsäure, setzt diese gleich Glucose[1], zieht diesen Wert von der tatsächlich als verbraucht gefundenen Glucose ab und berechnet den ö. K. So erhält man den korrigierten Wert der vorletzten Spalte der Tabelle. Man sieht, daß nunmehr der Unterschied zwischen „Viel N“ und „Wenig N“ verschwunden ist. Führt man die gleiche Rechnung für „Wenig K“ (bei „Viel N“) durch, so bleibt der ö. K. ganz erheblich unter dem

[1] Streng genommen müßte natürlich der im Vergleich zu Glucose um rund 10% geringere Energiewert der Gluconsäure berücksichtigt werden. Aber abgesehen davon, daß die Zahlen sich kaum verschieben würden, wird der kleine Fehler ja in beiden Fällen gemacht, so daß die Vergleichsmöglichkeit bestehen bleibt.

Normalwert. Man kann also wohl sagen, daß bei Kalimangel eine besonders große „Verschwendung" im Verbrauch der Glucose getrieben wird.

4. Kaliumgehalt verschiedener Stämme von Aspergillus niger.

Unsere fünf Stämme von *Aspergillus niger* unterscheiden sich physiologisch in der eingangs gekennzeichneten Richtung. Diese Eigenschaft ist bei unserem Impfmaterial bisher konstant geblieben, kann aber, wie an anderer Stelle zu zeigen sein wird, abgeändert werden[1]. Allerdings haben die drei wenig Oxalsäure bildenden Stämme allmählich eine immer stärker hervortretende Neigung zur Bildung von Oxalsäure gezeigt, ohne daß indessen das gekennzeichnete Bild grundsätzlich verändert ist. Bemerkenswert ist nun der verschiedene Kaligehalt dieser Stämme, den Tabelle VIII zeigt.

Tabelle VIII.

Kalium-, Natrium-, Aschengehalt des Mycels der fünf Stämme und Oxalsauregehalt des Substrats im Alter von 3, 6 und 9 Tagen auf physikalisch-alkalischem Substrat. Natriumnitrat als Stickstoffquelle.

Stamm	Mycelgewicht g	p_H	Asche %	K_2O %	Na_2O %	Oxalsäure in einer Kultur g
		Alter 3 Tage.				
Gottingen alt	0,735	3,74	4,50	1,08 (1,90)	1,19	—
Fulda	0,753	4,00	5,17	1,27 (2,38)	1,21	—
Zwetsche	0,793	3,79	4,49	1,30 (1,55)	1,03	—
Berlin	0,643 (0,490)	2,64 (1,76)	5,73	2,06 (2,61)	1,22	0,132
Gottingen neu	0,914	3,12	5,39	2,00 (2,60)	0,84	0,060
		Alter 6 Tage.				
Gottingen alt	0,925	3,57	2,96	0,67 (1,28)	0,85	—
Fulda	0,977	3,65	4,07	0,68 (2,44)	1,49	—
Zwetsche	0,850	3,60	2,76	0,60 (1,44)	0,68	—
Berlin	1,842 (1,026)	2,32 (1,43)	4,18	1,57 (0,62)	0,27	0,598
Gottingen neu	1,386	3,01	3,72	1,31 (1,48)	0,49	0,288
		Alter 9 Tage.				
Gottingen alt	1,245	3,52	3,37	0,57 (1,50)	1,15	0,005
Fulda	1,310	3,51	4,21	0,60 (3,46)	1,63	0,004
Zwetsche	1,184	3,56	2,83	0,55 (1,80)	0,90	0,005
Berlin	2,481 (1,421)	2,52 (1,28)	4,42	1,59 (0,54)	0,56	0,742
Gottingen neu	2,138	2,90	3,29	0,99 (1,35)	0,51	0,454

Nahrlösung: 10 % Handelsrohrzucker; 1,3 % $NaNO_3$; 0,25 % KH_2PO_4; 0,125 % $MgSO_4$; 0,005 % $ZnSO_4$. 75 ccm in 250er Kölbchen. 14. Oktober 1930 geimpft. Temperatur 28 bis 30° C.

---

[1] Es sei dabei darauf hingewiesen, daß es sich in *diesem* Falle tatsächlich um eine Veränderung handelt, nicht um den Einfluß äußerer Faktoren, denen *Kluyver* (zitiert weiter unten) eine große Bedeutung beimißt, die ja auch tatsächlich vorhanden ist.

Der Kaligehalt ist also bei den beiden stark Oxalsäure bildenden Stämmen annähernd doppelt so hoch wie bei den anderen. Da das Mycelgewicht bei jenen beiden ebenfalls höher ist, so ist die Erscheinung nicht etwa aus der bekannten Tatsache des höheren Gehaltes bei geringerer Masse zu erklären. Es könnte scheinen, als ob der höhere Kaligehalt in einem entsprechend geringeren Natriumgehalt seine Erklärung fände. Doch zeigt die nächste Tabelle IX, daß auch diese Erklärung versagt. Bei diesem Versuch wurde der Nährlösung kein Natrium zugesetzt. Dieser Versuch zeigt auch weiter, daß das Mycelgewicht der beiden Oxalsäurestämme nicht immer höher ist als das der drei anderen. Hier zeigt sich auch die im Laufe der Zeit stärker gewordene Oxalsäurebildung, von der oben schon gesprochen wurde. Es muß allerdings dahingestellt bleiben, ob diese einen innerphysiologischen Grund hat oder vielleicht auf irgendwelche Bestandteile der Nährlösung, die nicht erfaßt werden können, zurückgeführt werden muß. In einem mit diesem gleichzeitig angesetzten Versuch *mit* Natrium ergab sich das gleiche Bild; auch war hier der Natriumgehalt der Oxalsäurekulturen nicht höher als der Gehalt der drei anderen Kulturen daran.

Tabelle IX.

Kalium-, Natrium-, Aschengehalt des Mycels der fünf Stämme und Oxalsäuregehalt des Substrats im Alter von 3, 6 und 9 Tagen auf physiologisch-alkalischem Substrat.

Kaliumnitrat als Stickstoffquelle.

Stamm	Mycelgewicht g	p_H	Asche %	K_2O %	Na_2O %	Oxalsäure in einer Kultur g
			Alter 3 Tage.			
Göttingen alt	0,662	3,79	4,64	2,19	0,12	—
Fulda	0,655	3,78	4,92	2,34	0,11	—
Zwetsche	0,538	3,89	5,12	2,29	0,26	—
Berlin	0,452	2,20	8,40	3,56	0,19	0,297
Göttingen neu	0,597	2,34	6,98	3,12	0,14	0.278
			Alter 6 Tage.			
Göttingen alt	2,399	3,84	3,33	1,60	0,05	0,075
Fulda	2,324	3,83	3,63	1,89	0,05	0,109
Zwetsche	2,326	3,67	3,29	1,68	0,06	0,075
Berlin	1,606	1,64	6,69	3,59	0,06	1,265
Göttingen neu	2,093	1,86	5,07	2,67	0,06	1,150
			Alter 9 Tage.			
Göttingen alt	2,720	4,51	3,97	2,17	0,039	0,242
Fulda	2,679	3,89	3,90	2,03	0,048	0,173
Zwetsche	2,280	3,78	2,67	1,29	0,057	0,081
Berlin	1,830	1,62	4,30	2,31	0,068	1,438
Göttingen neu	2,175	1,82	4,85	2,48	0,063	1,323

Nährlösung: wie in Tabelle IX, nur KNO_3 statt $NaNO_3$. 10. März 1931 geimpft.

In einem weiteren vor dem Versuch der Tabelle VIII angesetzten Versuch ergab sich allerdings eine Abweichung; die Zahlen sind in Tabelle VIII in Klammern beigefügt. Dort ist nur im Alter von 3 Tagen der höhere Kaligehalt der Oxalsäurestämme vorhanden, in den beiden weiteren Alterstadien ist er dagegen wesentlich niedriger. Auch hierfür kann eine Erklärung nicht gegeben werden. Immerhin sei bemerkt, daß namentlich bei dem *Stamm Berlin*, der die Ausnahme besonders stark zeigt, Mycelgewicht und p_H besonders niedrig waren. Der p_H-Wert sank schon bei dreitägiger Kulturdauer unter 2. Auch diese Zahlen sind in Tabelle VIII in Klammern angegeben.

Was den „normalerweise" höheren Kaligehalt der Oxalsäurestämme betrifft, so hätte man vielleicht gerade das Gegenteil erwarten können, daß sie nämlich vom gebotenen Kalium weniger Nutzen ziehen könnten und demnach mehr Oxalsäure bilden, entsprechend dem Ausfall der oben geschilderten Versuche. Sonst müßte man annehmen, daß sie vom Kalium deshalb keinen Nutzen ziehen könnten, weil sie es in einer unwirksamen Form speicherten, oder aber, daß sie sozusagen · durch gewaltsame Aufspeicherung des Kaliums der schnellen Oxalsäurebildung entgegenarbeiten wollten. Damit entfernen wir uns aber von jeder greifbaren Grundlage, so daß wir die auffallende Erscheinung eben in keiner Weise wirklich zu erklären vermögen.

5. Stärkegehalt von Aspergillus-Mycel mit und ohne Kalium.

Da man bei höheren Pflanzen vielfach[1] geringeren Kohlenhydratgehalt bei Kalimangel gefunden hat, so lag es nahe, die bekannte „Stärke"speicherung bei *Aspergillus* in dieser Hinsicht zu untersuchen. Tatsächlich ergaben Kulturen ohne Kalium keine Jodreaktion gegenüber solchen mit Kalium in üblicher Nährlösung mit Ammoniumsulfat als N-Quelle. Indessen war mit Kalium der p_H-Wert wesentlich niedriger, natürlich infolge der stärkeren Verarbeitung des Ammoniumsulfats. Wir setzten daher den Kulturen ohne Kalium von vornherein freie Schwefelsäure zu. Tabelle X oben zeigt jedoch, daß der p_H-Unterschied von noch nicht einer Einheit möglicherweise noch die bei Kalimangel fehlende „Stärke"anhäufung verursachen konnte. In einem anderen Versuch (Tabelle X unten) fügten wir daher noch mehr freie Schwefelsäure hinzu mit dem Erfolg, daß nunmehr der p_H-Wert, vom Ausgangswert abgesehen, während der ganzen Versuchsdauer bei „mit" und „ohne Kalium" fast gleich war. Nun zeigten auch die Mangelkulturen schöne Jodreaktion. Um uns nicht auf den Augenschein verlassen zu

[1] Bei eigenen, nicht veröffentlichten Versuchen fanden wir zwar in Kartoffelblättern und -stengeln bei Kalimangel geringeren Gehalt an Zucker, nicht dagegen in Tomaten- und Erbsenstengeln und -blättern.

Tabelle X.

Alter in Tagen	p_H-Wert		Stärkereaktion	
	mit Kalium	ohne Kalium	mit Kalium	ohne Kalium
0	4,37	3,14		
3	1,55	2,54	stark	0
5	1,61	2,39	„	0
7	1,66	2,38	„	0
12	1,70	2,13	„	Spuren

Nährlösung: Rohrzucker 10%; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0%; $MgSO_4$ 0,125%; $ZnSO_4$ 0,005%. Mit Kalium: 0,25% KH_2PO_4; ohne Kalium: 0,287% NaH_2PO_4 und 1 ccm H_2SO_4 1 : 5. Geimpft 14. Februar 1934. 75 ccm Nährlosung in 250er Kolben. Temperatur 28 bis 30° C.

Alter in Tagen	Mit Kalium				Ohne Kalium			
	Mycel trocken g	p_H	Stärkereaktion	Zucker in % durch Hydrolyse*	Mycel trocken g	p_H	Stärkereaktion	Zucker in % durch Hydrolyse*
0		4,41				1,89		
4	0,96	1,75	+	18,3	0,31	1,77	+	19,2
6	1,25	1,47	++	20,3	0,40	1,57	+	20,1
12	2,94	2,13	+++	23,5	0,74	2,13	++	21,2
16	2,90	2,09	++++	23,5	1,50	1,88	+++	25,3

* Als Glucose berechnet.

Nahrlosung: Rohrzucker 10%; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0%; $MgSO_4$ 0,125%; $ZnSO_4$ 0,005%. Mit Kalium: 0,20% K_2SO_4; ohne Kalium: 0,290% NaH_2PO_4 und 10 ccm H_2SO_4 1 : 5. Geimpft 24. Marz 1934. 75 ccm Nahrlösung in 250er Kolben. Temperatur 28 bis 30° C.

müssen, führten wir eine Hydrolyse des Pilzmycels durch (mit 1%iger HCl 3 bis 4 Stunden am Ruckflußkühler gekocht) und bestimmten den gebildeten Zucker nach *Fehling*: die Werte finden sich ebenfalls in Tabelle X unten. Man sieht also, daß der Kohlenhydratgehalt des Kalimangelmycels nunmehr genau der gleiche ist wie der des normalen Mycels. Wenn also Kalimangelmycel keine Stärkereaktion gibt, so liegt das nur an der im Vergleich zur Normalkultur geringeren Aziditat. Eine genügend hohe Wasserstoffionenkonzentration ist demnach bei Kalimangel ebenso wie bei der Normalkultur die Vorbedingung für die „Stärke"anhäufung im *Aspergillus*-Mycel[1].

Besprechung der Ergebnisse.

Überblickt man die mitgeteilten Ergebnisse, so kann man sich des Eindrucks nicht erwehren, daß Kalimangel zu Erscheinungen führt,

[1] Die letzte Bearbeitung: *T. Hida*, Journ. of the Shanghai Sc. Inst. Sect. IV, 1, 85, 1934.

die einem frühzeitigen Altern der Pilzkulturen entsprechen[1]. Das zeigt sich vor allem in der frühzeitigeren und stärkeren Bildung des End-Säureproduktes, der Oxalsäure, ferner in dem niedrigen ökonomischen Koeffizienten, endlich in dem erheblich höheren Ammoniakgehalt des Mycels. In diesem letzten Falle allerdings ist es nicht unbedingt sicher, ob es sich nicht um bei der Nitratreduktion unverarbeitet gebliebenes Ammoniak handelt. Im Zusammenhang aber mit den beiden erstgenannten Erscheinungen wird man eine weitere Berechtigung zu der Annahme erblicken dürfen, daß es sich tatsächlich um autolytisch entstandenes Ammoniak handelt. Und selbst wenn das nicht der Fall wäre, würde sich doch nicht viel ändern. Denn die Frage lautete dann, warum das NH_3 nicht verarbeitet wird, obwohl genügend Kohlenstoffmaterial zur Verfügung steht. Der Pilz verhält sich also praktisch so, „als ob" es sich um autolytisch entstandenes Ammoniak handele: Hier würde es sich um einen tatsächlichen, dort um einen „physiologischen" Kohlenstoffmangel handeln.

Wenn nun bei Kalimangel ein frühes Altersstadium eintritt, so erschiene die Annahme einfach, daß entsprechend der Auffassung von *Mothes*[2] eben das Oxydationspotential verschoben, die Oxydation weniger intensiv ist und somit die Abbauerscheinungen mehr in den Vordergrund treten. Damit könnte gleichzeitig die Auffassung von *Schmalfuss*[3] in Einklang stehen, wonach Kalimangel eine Entquellung des Plasmas herbeiführe, eine Erscheinung, die wir ebenfalls dem alternden Plasma zuschreiben müssen[4].

So verführerisch die Annahme eines solchen Zusammenhanges auch scheinen mag, so stehen ihr doch schwere Bedenken entgegen. Denn die Anschauung von *Mothes* würde bei Kalimangel sinngemäß ein Zurücktreten der Atmung fordern. Wir haben aber gesehen, daß in unseren Versuchen gerade die oxydativen Vorgänge gesteigert erscheinen, die hier zum stärkeren Hervortreten der Oxalsäure führen. Berechnet man aus Tabelle II für den Zeitpunkt der maximalen Gluconsäurebildung (Gluconsäure korrigiert), in welchem Stadium also das Leben des Pilzes noch „normal" ablief, den Sauerstoffverbrauch, so ergibt sich

[1] Die Sporenbildung ist hier nicht berücksichtigt, weil wir zwar in vielen Fällen die Angabe in der Literatur bestätigt fanden, daß K-armes Mycel schlechter Sporen bildete als K-reiches Mycel, in vielen anderen Fällen jedoch durchaus schwankende Ergebnisse hatten. — [2] *K. Mothes*, Flora, N. F. 28, 58, 1933; Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 51, (31), 1933. — [3] Zitiert S. 564, Anm. 1. — [4] Wir haben diese Angabe bei *Aspergillus* nicht nachgeprüft, da uns hier das Frischgewicht eine schlecht bestimmbare Größe scheint, weil wir das Kapillarwasser nicht kennen. *P. Bretin*, *P. Manceau* u. *J. Rey* (C. r. Soc. Biol. 106, 197, 1931) machen jedenfalls Angaben, wonach bei *Penicillium* mit steigenden KNO_3-Mengen der Trockensubstanzgehalt des Frischgewichtes konstant bleibt.

	O_2-Verbrauch mg	O_2 je 1 g Mycel mg
Mit Kalium	57,5	73,4
Ohne Kalium	50,7 + 3,2*	187,2

* Die Zahl 3,2 gilt für die gebildete Oxalsäure.

Die Atmung ist also, wie ja aus den Säurezahlen schon ohne weiteres hervorgeht, bei Kalimangel ganz erheblich höher als bei guter Versorgung mit Kali. Würde man nicht das Maximum der korrigierten, sondern der freien Gluconsäure nehmen, so würde der Unterschied noch weit größer werden[1]. Daß andererseits bei guter Kaliversorgung nicht etwa mehr Zucker veratmet wird, so daß die Berechnung des Sauerstoffs aus den Säuren ein falsches Bild ergeben würde, zeigen die bei Kalimangel geringeren ökonomischen Koeffizienten (S. 569, Tabelle VII).

Den oben erwogenen Gedankengang können wir hier also nicht anwenden, würden dagegen keinen Widerspruch zu unserer an anderer Stelle[2] dargelegten Auffassung sehen, daß Kalimangel irgendwie den normalen Umsatz der Kohlenhydrate stört. Wenn diese Auffassung einer Beteiligung des Kaliums an dem Umsatz der Kohlenhydrate richtig ist, so könnte nach den vorliegenden Versuchen die Vermutung auftauchen, daß die (unmittelbare oder mittelbare) Wirkung des Kaliums auf einer sehr frühen Stufe des Zuckerumsatzes liegen muß, noch vor der Entstehung der Gluconsäure im vorliegenden Falle, da deren Entstehung sowie weitere Verarbeitung durch Kalimangel offenbar nicht beeinflußt erscheint, sich sogar stärker vollzieht als bei guter Versorgung mit Kalium.

Weiter wäre dann nicht ausgeschlossen, daß die Kaliwirkung irgendwie mit synthetischen Vorgängen verknüpft sei, woraus sich wenigstens ungezwungen das frühzeitige Eintreten des Alterns bei Kalimangel erklären würde. Es müßte aber dahingestellt bleiben, ob hier das Primäre eine Störung in der Synthese der N-freien oder der N-haltigen Stoffe sei, wenn diese Trennung überhaupt in diesem Zusammenhang möglich ist. Jedenfalls würde der nach *v. Doby*[3] bei K-armem *Penicillium*-Mycel gesteigerte Gehalt an zuckerspaltenden Enzymen dem nicht widersprechen, wobei allerdings zu beachten ist,

[1] Weitere Versuche hierzu sind im Gange. Eine CO_2-Bestimmung kommt nicht in Frage wegen der unvollkommen oxydierten Produkte, sondern eher die Messung des Sauerstoffverbrauchs. Noch besser scheint uns die kalorimetrische Feststellung der potentiellen Restenergie in der Nährlösung. — [2] Zitiert S. 564, Anm. 2. — [3] *G. v. Doby* u. *Z. J. Kertész*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 189, 177, 1930.

daß auch bei N-Mangel eine stärkere Saccharasekonzentration gefunden wurde[1].

Mit synthetischen Vorgängen wird man auch über die Synthese von Eiweiß usw. hinaus zu rechnen haben; es braucht nur an den von *Aspergillus* in Menge gebildeten stärkeähnlichen Körper hingewiesen zu werden, den *Schmidt*[2] für Amylose hält, sowie darauf, daß nach *Hida*[3] 25 bis 70 % des verbrauchten Zuckers in eine Substanz noch nicht bekannter Natur, aber nicht von Polysaccharidcharakter umgewandelt werden. *Kluyver*[4] hat sehr richtig darauf hingewiesen, daß man den Chemismus von *Aspergillus* nicht etwa durch eine einfache Umwandlung von z. B. Essigsäure oder dergleichen erfassen könne, da vorher möglicherweise synthetische Vorgänge (intermediäre Bildung von Kohlenhydraten reservestoffartiger Natur) liegen würden.

Solche Vorgänge sind durchaus denkbar, wie die Bildung des stärkeähnlichen Körpers zeigt. In diesem Zusammenhang sei noch darauf hingewiesen, daß auch Pentosen als C-Quelle für *Aspergillus* geeignet sind, wie ja auch für *Milch-* und *Buttersäurebakterien* 5-Zucker ein geeignetes Ausgangsmaterial darstellen. Für die Einheitlichkeit der Stoffwechselvorgänge wäre aber die Vorstellung erheblich einfacher, daß in diesem Falle die Einleitung des Zuckerzerfalls mit einer die 6-Kohlenstoffkette (gegebenenfalls mal x) herstellenden Synthese beginnt, als die Annahme eines jeweilig auf Pentosen oder Hexosen eingestellten unmittelbaren Zerfalls. Wenn man das aber in diesem Falle annehmen müßte, so müßte man es auch für die Hexose allein in Betracht ziehen.

Die oben behandelten Versuche über die auch bei Kalimangel erfolgende Bildung der Pilzstärke könnten der eben entwickelten Vorstellung widersprechen. Aber es ist nicht ohne weiteres anzunehmen, daß gerade *dieser* Körper das fragliche synthetische Produkt sein müßte. Im Gegenteil ist es wahrscheinlicher, daß dieses ein anderer — vielleicht labiler — Körper ist, verschieden von den Stoffen reservestoffartiger Natur, die gerade wegen ihrer Aufgabe der Aufbewahrung von stabilerem Bau sein müßten. Wenn oben als Beweis für die Tatsache synthetischer Vorgänge vom Zucker aus die Pilzstärke herangezogen würde, so kann

[1] *G. v. Doby*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **213**, 71, 1932. *M. Cattle* (New Phytologist **32**, 364, 1933) erhielt bei *Bohnen* etwas verschiedene Ergebnisse, je nachdem es sich um im Winter oder um im Sommer gezüchtete Pflanzen handelte, im letzten Falle bei K-Mangel geringeren Invertase- und Diastasegehalt. Auf die übrige Literatur an höheren Pflanzen kann hier nicht eingegangen werden. Vgl. *G. Gassner* u. *G. Goeze*, Zeitschr. f. Bot. **27**, 257, 1934. — [2] *D. Schmidt*, Biochem. Zeitschr. **158**, 223, 1925. — [3] Zit. S. 573, Anm. 1. — [4] *A. J. Kluyver* u. *L. H. C. Perquin*, Biochem. Zeitschr. **266**, 68, 1933.

das also nur als Beispiel für eine solche Möglichkeit überhaupt, nicht aber für den Weg selbst dienen.

Von diesem Gesichtspunkt aus wäre es wichtig zu wissen, wie Kalium auf Teilvorgänge des Zuckerabbaues wirkt. Die Wirkung auf Enzyme wurde bereits erwähnt. In dieser Hinsicht ist es weiterhin auffallend, daß *Krehan*[1] bei *B. acetigenoideum* eine überraschend geringe Wirkung von Kalisalzen auf Wachstum und insbesondere Säuerung von Äthylalkohol fand; Kaliumsulfat hatte sogar eine beide Vorgänge völlig unterbindende Giftwirkung. Auch für *Paratyphus B*-Bakterien, *Pyocyaneus* und *Coli* fand *Friedlein*[2] Kalium völlig entbehrlich, während eine Wirkung von Magnesium und Schwefel, Elementen, die sonst im Vergleich zum Kalium in sehr viel geringerer Menge wirksam sind, nachgewiesen werden konnte. Es sei noch darauf hingewiesen, daß diese Versuche in Quarzkölbchen ausgeführt wurden, also ein Alkaligehalt des Glases keine Rolle spielen konnte. Man sträubt sich allerdings etwas dagegen, tatsächlich in diesen Fällen das Kalium für entbehrlich anzusehen, und eine Nachprüfung wäre höchst erwünscht. Aber es erscheint nicht ausgeschlossen, daß sich dabei Gesichtspunkte ergeben könnten, wie sie hier herausgestellt wurden. Es muß allerdings beachtet werden, daß auch hier die synthetischen Vorgänge des normalen Wachstums stattfanden.

Zusammenfassung.

Kalimangel führt bei *Aspergillus niger* zu folgenden Erscheinungen: Auftreten von Oxalsäure bereits im sauren Gebiet und von viel Ammoniak im Mycel; der ökonomische Koeffizient ist stark verringert. Alle Erscheinungen deuten auf ein frühes Eintreten des Altersstadiums.

Es wird versucht zu zeigen, daß dem Kalium eine Rolle beim Umsatz der Kohlenhydrate zukommen könnte, die aber bei einem sehr frühen Stadium liegen müßte. Es ist nicht ausgeschlossen, daß dafür synthetische Vorgänge in Frage kommen, die auch der Verarbeitung der Hexosen vorangehen. Die Pilzstärke wird allerdings, genügend hohe Konzentration der Wasserstoffionen vorausgesetzt, bei Kalimangel ebenso kräftig gespeichert wie bei guter Kaliversorgung.

Stämme von *Aspergillus niger* mit starker Oxalsäurebildung hatten etwa doppelt so hohen Gehalt an Kalium wie Stämme mit geringer Oxalsäurebildung.

[1] *M. Krehan*, diese Zeitschr. 3, 277, 1932. — [2] *F. Friedlein*, Biochem. Zeitschr. 194, 273, 1928. Hier weitere Literatur.

Autorenverzeichnis.

Sachverzeichnis.

Vorbemerkung: Wegen der verschiedenen Handhabung der Bakterienbezeichnungen sind die Namen *Bacillus* und *Bacterium* (teilweise auch *Pseudomonas*) unter einem Stichwort zusammengefaßt, wobei für die Artbezeichnung die Neutrumform gewählt ist (z. B. *B. prodigiosum* usw.). Eine wissenschaftliche Stellungnahme ist damit nicht zum Ausdruck gebracht.

Pflanzen-, Tier- und Personennamen sind *kursiv* gedruckt; neue Gattungs- und Artnamen sind durch **Fett**druck hervorgehoben. **Fett**druck der Seitenzahlen bedeutet, daß der Gegenstand ausführlicher behandelt ist.



A. Imšenecki, Granulobacter pectinovorum.